



Centro de Biología Molecular Severo Ochoa (CSIC-UAM)
Departamento de Biología Molecular
Facultad de Ciencias
Universidad Autónoma de Madrid

LA FORMINA INF2 REGULA EL TRANSPORTE DE LCK Y LA REORIENTACIÓN DEL CENTROSOMA A LA SINAPSIS INMUNOLÓGICA DE LOS LINFOCITOS T

Memoria presentada por la Licenciada en Bioquímica:

Laura Andrés Delgado

para optar al título de Doctora en Ciencias
por la Universidad Autónoma de Madrid

Tesis dirigida por el **Dr. Miguel Ángel Alonso Lebrero**

En Madrid, a 4 de enero de 2011

Esta tesis ha sido realizada en el laboratorio del Dr. Miguel Ángel Alonso Lebrero, en el Centro de Biología Molecular Severo Ochoa (CSIC, Cantoblanco, Madrid), con una beca predoctoral para la Formación de Personal Investigador financiada por el Ministerio de Ciencia e Innovación, referencia de la beca: BES-2005-7345. Durante el desarrollo del trabajo se realizó una estancia de tres meses en el laboratorio del Dr. Gregg G. Gundersen en el Departamento de Pathology and Cell Biology de la Universidad de Columbia (New York, NY; EEUU) gracias a una ayuda para la realización de estancias breves del Ministerio de Ciencia e Innovación.

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS

Índice de figuras.....	3
------------------------	---

SUMMARY

Summary.....	9
--------------	---

ABREVIATURAS

Abreviaturas.....	13
-------------------	----

1.-INTRODUCCIÓN

1. EL LINFOCITO T

1.1. Los linfocitos T.....	17
1.2. La sinapsis inmunológica.....	17
1.3. Las balsas de membrana en la activación del linfocito T.....	19
1.4. La proteína Lck.....	20
1.5. Transporte vesicular en linfocitos T.....	22
1.6. Reorganización del citoesqueleto durante la formación de la sinapsis inmunológica.....	23
1.7. La línea celular Jurkat.....	25

2. MAL

2.1. La proteína MAL.....	26
2.2. Función de MAL en células epiteliales polarizadas.....	26
2.3. MAL en los linfocitos T.....	27

3. INF2

3.1. Las forminas.....	29
3.2. Las forminas en el tráfico vesicular.....	31
3.3. Papel de las forminas durante la activación de los linfocitos T.....	32
3.4. La formina INF2.....	32
3.5. MAL2 interacciona con la formina INF2 y regula el transporte de proteínas desde la membrana basolateral a la apical.....	35

4. MICROTÚBULOS ESTABLES

4.1. Microtúbulos estables frente a dinámicos.....	36
4.2. Microtúbulos estables en células epiteliales polarizadas.....	38
4.3. Microtúbulos estables en linfocitos.....	40

2.-OBJETIVOS

Objetivos del trabajo de investigación.....	45
---	----

3.-MATERIALES Y MÉTODOS

1. MATERIALES

1.1. Líneas celulares y células primarias.....	49
1.2. Anticuerpos.....	49
1.3. Reactivos.....	50
1.4. Plásmidos y oligonucleótidos.....	50

2. MÉTODOS

2.1. Cultivos celulares.....	53
2.2. Experimentos de conjugación.....	53
2.3. Transfección.....	54
2.4. Análisis de microscopía de fluorescencia.....	54
2.5. Videomicroscopía.....	54
2.6. Electroforesis e inmunotransferencia.....	55
2.7. Aislamiento de membranas resistentes a detergente (DRMs).....	55
2.8. Aislamiento y transfección de linfocitos t de sangre periférica (PBLs).....	56
2.9. Análisis de interacciones directas por el sistema de doble-híbrido de levadura.....	56
2.10. Ensayos de “pull-down”.....	56
2.11. Unión a microtúbulos.....	57
2.12. Estabilización de microtúbulos.....	57

4.-RESULTADOS

1. La formina INF2 interacciona con MAL.....	63
2. INF2 es necesaria para la formación de vesículas de transporte que contienen MAL.....	64
3. INF2 es necesaria para el transporte de Lck a la membrana plasmática.....	66
4. Las vesículas MAL ⁺ se mueven a lo largo de los microtúbulos.....	68
5. Las actividades polimerizadora y despolimerizadora de INF2 son necesarias para el transporte de Lck a la membrana plasmática.....	70
6. Cdc42 y Rac1 son necesarias para el transporte de Lck a la membrana plasmática.....	73
7. El transporte de Lck en linfocitos T primarios está regulado de la misma forma que en células Jurkat.....	75
8. La formina INF2 es necesaria para la reorientación del centrosoma hacia la SI.....	76
9. La polarización del centrosoma no requiere las actividades polimerizadora/despolimerizadora de actina de INF2.....	79
10. El dominio FH2 de INF2 es capaz de restaurar el proceso de reorientación del centrosoma hacia la SI.....	81
11. La SI desencadena la estabilización de microtúbulos e INF2 es necesaria para este proceso.....	82
12. INF2 se une directamente a microtúbulos.....	85
13. Cdc42 y Rac1 son necesarias para la reorientación del centrosoma hacia la SI y para la generación de microtúbulos estables.....	
14. INF2, Rac1 y Cdc42 son necesarias para la reorientación del centrosoma y la generación de microtúbulos estables también en linfocitos T primarios.....	87
	89

5.-DISCUSIÓN

1. INF2 no es una formina invertida.....	93
2. INF2 interacciona con Rac1 y Cdc42.....	94
3. INF2 regula la formación de las vesículas MAL ⁺	96
4. INF2 controla el transporte de Lck a la membrana plasmática.....	97
5. INF2 es necesaria para la reorientación del centrosoma a la sinapsis inmunológica.....	99

6. La polimerización de actina en la sinapsis inmunológica y la reorientación del centrosoma son dos procesos independientes.....	100
7. La activación de los linfocitos T induce la formación de Glu-MT en un proceso dependiente de la expresión de INF2.....	100
8. Rac1 y Cdc42, pero no RhoA, regulan la reorientación del centrosoma y la formación de Glu-MT mediada por INF2.....	101
9. La reorientación del centrosoma y la formación de Glu-MT está regulada por forminas en linfocitos T.....	103
10. EL FH2 como dominio responsable de la unión a microtúbulos y de la formación de Glu-MT.....	105
11. Papel de los Glu-MT estables en la reorientación del centrosoma y el transporte vesicular polarizado.....	105
 <u>6.-CONCLUSIONES</u>	
Conclusiones.....	109
 <u>BIBLIOGRAFÍA</u>	
Bibliografía.....	113
 <u>ANEXO</u>	
Artículos publicados por la doctoranda durante la tesis doctoral.....	125

ÍNDICE DE FIGURAS

1.-INTRODUCCIÓN

Figura 1.1. Organización de la sinapsis inmunológica en el SMAC.....	18
Figura 1.2. Rutas de señalización durante la activación del linfocito T.....	20
Figura 1.3. Estructura y regulación de la proteína Lck.....	21
Figura 1.4. Transporte de proteínas a la SI en linfocitos T.....	22
Figura 1.5. Cambios morfológicos y del citoesqueleto durante la formación de una SI...	24
Figura 1.6. La familia de las RhoGTPasas.....	25
Figura 1.7. La familia MAL de proteínas.....	27
Figura 1.8. Esquema del transporte mediado por MAL, transporte apical directo, y MAL2, transcitosis, en células epiteliales polarizadas.....	28
Figura 1.9. Esquema del transporte de Lck hacia el cSMAC en la SI, mediado por MAL, en linfocitos T.....	29
Figura 1.10. Regulación molecular de las forminas Drf.....	31
Figura 1.11. Las forminas y el complejo Arp 2/3 actúan en procesos distintos en linfocitos T.....	33
Figura 1.12. La formina INF2.....	34
Figura 1.13. La formina INF2 se une a MAL2, un componente de la maquinaria de transcitosis.....	36
Figura 1.14. Ciclo de tirosinación-detirosinación de la tubulina.....	37
Figura 1.15. Microtúbulos estables.....	38
Figura 1.16. Esquema de los microtúbulos estables en fibroblastos en migración.....	39

3.-MATERIALES Y MÉTODOS

Figura 3.1. Esquema de los anticuerpos generados contra INF2.....	49
Figura 3.2. Esquema de las construcciones de INF2.....	51
Figura 3.3. Esquema de los plásmidos pSuper shINF2.....	52
Tabla I. Secuencias diana utilizadas para la construcción de plásmidos que expresan shARN.....	53

4.- RESULTADOS

Figura 4.1. Caracterización de INF2 como proteína que interacciona con MAL.....	63
Figura 4.2. Distribución subcelular de INF2 en células Jurkat.....	64
Figura 4.3. La expresión de shARN específicos disminuye los niveles de INF2 en células Jurkat.....	65
Figura 4.4. El silenciamiento de INF2 disminuye la expresión de MAL en la membrana plasmática.....	65
Figura 4.5. El silenciamiento de INF2 bloquea la salida de vesículas MAL+ desde la región perinuclear.....	66
Figura 4.6. El silenciamiento de INF2 disminuye la expresión de Lck en la membrana plasmática.....	67
Figura 4.7. El silenciamiento de INF2 bloquea la formación de vesículas de transporte exocítico que contienen Lck.....	67
Figura 4.8. La expresión de Cterm1 disminuye los niveles de Lck en la membrana plasmática.....	68
Figura 4.9. Las vesículas de MAL y Lck se mueven a lo largo de los microtúbulos.....	69
Figura 4.10. Las vesículas de MAL se mueven detrás de EB3.....	69
Figura 4.11. El silenciamiento de INF2 no afecta a la distribución de los citoesqueletos de actina o tubulina.....	70
Figura 4.12. Las actividades polimerizadora y despolimerizadora de INF2 son necesarias para la expresión de Lck en membrana plasmática.....	71
Figura 4.13. La dinámica de actina es necesaria para el transporte exocítico de Lck.....	72
Figura 4.14. La integridad del citoesqueleto de tubulina es necesaria para la expresión de Lck y MAL en la membrana plasmática.....	72
Figura 4.15. INF2 se une a Rac1 y a Cdc42.....	73
Figura 4.16. Rac1 y Cdc42 son necesarias para el transporte de Lck a membrana plasmática.....	74
Figura 4.17. Rac1 y Cdc42 colocalizan parcialmente con INF2.....	75
Figura 4.18. Cdc42, Rac1 e INF2 son necesarias para la distribución normal de Lck en la membrana plasmática de células T primarias.....	75
Figura 4.19. INF2 se polariza hacia la SI.....	76
Figura 4.20. La forma INF2 es necesaria para la polarización de Lck a la SI.....	77

Figura 4.21. INF2 es necesaria para la reorientación del centrosoma a la SI.....	77
Figura 4.22. INF2 es necesaria para la polarización del TCR a la SI.....	78
Figura 4.23. Videomicrocopía de la actina y del centrosoma en células silenciadas para INF2 durante la formación de la SI.....	79
Figura 4.24. La expresión forzada de Lck en la membrana plasmática no restaura la reorientación del centrosoma a la SI.....	80
Figura 4.25. La reorientación del centrosoma es independiente de las actividades polimerizadora/despolimerizadora de actina de INF2.....	80
Figura 4.26. La dinámica de actina no es necesaria para la reorientación del centrosoma	81
Figura 4.27. El fragmento FH2 de INF2 es suficiente para reorientar el centrosoma.....	82
Figura 4.28. La activación de la célula T desencadena la formación de Glu-MT.....	83
Figura 4.29. La formina INF2 es necesaria para la generación de Glu-MT.....	84
Figura 4.30. El fragmento FH2 de INF2 es suficiente para generar Glu-MT.....	85
Figura 4.31. INF2 se une directamente a microtúbulos.....	86
Figura 4.32. INF2 estabiliza microtúbulos frente a la despolimerización por frío.....	87
Figura 4.33. Cdc42 y Rac1 son necesarias para la reorientación del centrosoma.....	88
Figura 4.34. Cdc42 y Rac1 son necesarias para la generación de Glu-MT en la SI.....	88
Figura 4.35. INF2, Cdc42 y Rac1 son necesarias para la formación de Glu-MT en linfocitos T.....	89

5.-DISCUSIÓN

Figura 5. 1. Esquema de la organización en dominios de mDia y de INF2.....	93
Figura 5.2. Alineamiento de las secuencias del DAD de INF2, mDia1 y mDia2 con el dominio WH2 de WASP.	93
Figura 5. 3. Unión de las forminas a RhoGTPasas.....	94
Figura 5. 4. Unión de las INF2 a Rac1/Cdc42.....	95
Figura 5.5. Modelo propuesto para el transporte de Lck mediado por INF2 y MAL.....	98
Figura 5.6. Esquema de la polarización del centrosoma y de la estabilización de microtúbulos durante la formación de la SI.....	103
Figura 5.7 Ruta de forminas.....	104

SUMMARY

We have investigated the role of INF2, a member of the formin protein family, in resting T cells and T cells forming an immunological synapse (IS) in response to activation by antigen presented by an antigen-presenting cell.

Expression of the tyrosine kinase Lck at the plasma membrane is necessary for it to fulfil its role in signal transduction in T lymphocytes. MAL, an integral membrane protein, has been described to play an important role in targeting Lck to the plasma membrane. We have found that MAL interacts with INF2, a protein of the formin family with the unique ability of promoting not only actin polymerization but also its depolymerization. In resting Jurkat cells, INF2 colocalizes with MAL at the plasma membrane, pericentriolar endosomes and along microtubules. Time-lapse videomicroscopic analysis showed that MAL⁺ vesicles that transport Lck to the plasma membrane move along preformed microtubules tracks. Knockdown (KD) of INF2 impairs MAL⁺ vesicle formation and greatly reduced the levels of Lck at the plasma membrane. The actin polymerization and depolymerization activities of INF2 were both required for INF2-mediated transport of Lck. Rac1 and Cdc42, which bind to INF2, regulate the Lck targeting process both in Jurkat cells and primary T lymphocytes.

In addition to the specific targeting of receptors, adhesion molecules, signaling proteins and actin cytoskeletal proteins to the IS, an important event that takes place during IS formation is the reorientation of the centrosome to face the IS. We have found that in INF2 KD Jurkat cells, centrosome reorientation did not take place although actin polymerization at the IS occurred normally. Expression of intact INF2 or only its FH2 domain in INF2 KD cells was sufficient to restore centrosome polarization regardless of the actin polymerization and depolymerization activities of INF2. As we found that formation of stable detyrosinated microtubules (Glu-MT) accompanies the process of IS formation and centrosome reorientation, we investigated the role of INF2 in Glu-MT formation and found that INF2 was necessary for it to occur. The FH2 domain of INF2 was found to be sufficient for Glu-MT formation. KD of Rac1 or Cdc42, the two RhoGTPases to which INF2 binds, produced the same effect that INF2 KD on centrosome reorientation and Glu-MT formation. We, therefore, propose a novel pathway in T cells by which Rac1 and Cdc42 regulates INF2 that, in turn, regulates formation of stable Glu-MT required for centrosome orientation.

In conclusion, INF2 collaborates with MAL in vesicular transport of Lck to the plasma membrane in resting T cells and, in addition, plays an important role in the process of centrosome reorientation to the IS through the stabilization of a specific set of microtubules. Rac1 and Cdc42 appear to act upstream of INF2 regulating these processes.

ABREVIATURAS

Para las abreviaturas se ha utilizado la nomenclatura española en aquellos casos en los que existe, y la nomenclatura inglesa para el resto de los casos. Muchos acrónimos corresponden a palabras en inglés.

Acet: Tubulina acetilada
ADN: Ácido desoxirribinucleico
APC: Célula presentadora de antígeno (Antigen presenting cell)
ARN: Ácido ribonucleico
BSA: Albúmina bovina de suero (Bovine Serum Albumin)
CMTMR: 5-(and-6)-(((4-chloromethyl)benzoílo)amino)tetramethylrodamine
CRIB: Cdc42/Rac interactive binding domain
DAD: Diaphanous autoregulatory domain
DID: Diaphanous inhibitory domain
Drf: Diaphanous-related formins
DRMs: Membranas resistentes a detergentes (Detergent resistant membranes)
FH: Formin homology domain
GBD: GTPase binding domain
GDP: Guanosine diphosphate
GFP: Proteína verde fluorescente (Green Fluorescence Protein)
GTP: Guanosine triphosphate
Glu: Tubulina detirosinada
GPI: Glicosil fosfatidil-inositol (Glycosyl phosphatidyl inositol)
HA: Hemaglutinina
IL-2: Interleuquina 2
KD: Knockdown
MDCK: Células epiteliales renales caninas (Madine-Darby canine kidney cells)
MHC: Complejo principal de histocompatibilidad (Major histocompatibility complex)
MT: Microtúbulos
MTOC: Centro organizador de microtúbulos (Microtubule organizing center)
PBLs: Linfocitos de sangre periférica (Peripheral blood lymphocytes)
PBS: Phosphate Buffered Saline
SEE: Superantígeno E
SI: Sinapsis inmunológica
shARN: ARN pequeño en horquilla (Short hairpin RNA)
SMAC: Complejo supramolecular de activación (Supramolecular activation cluster)
TCR: Receptor de la célula T (T cell receptor)
Tyr: Tubulina tirosinada
WH2: WASP homology 2 domain

1.-INTRODUCCIÓN

1. EL LINFOCITO T

1.1. Los linfocitos T

La función fisiológica del sistema inmunitario es la defensa frente a agentes infecciosos. Para ello, cuenta con dos tipos de procesos: los mecanismos de la *inmunidad innata*, que son los que existen antes de que se desarrolle la infección, tales como barreras epiteliales, lisis por células Natural Killer (NK), proteólisis por proteínas del complemento, etc., y los de la *inmunidad adaptativa*, específicos frente a la infección que se esté desarrollando. Los componentes de esta última son los linfocitos y sus productos, anticuerpos y citoquinas entre otros.

Hay dos tipos de respuesta inmunitaria adaptativa, la humoral y la celular. Están mediadas por distintos componentes del sistema inmunitario y su función es eliminar diferentes tipos de microorganismos. En la inmunidad humoral participan los anticuerpos, producidos por los linfocitos B, cuya función es reconocer específicamente antígenos microbianos para la eliminación del patógeno, neutralizando así la infección. En la inmunidad celular participan los linfocitos T, que responden frente a microorganismos intracelulares, y cuya función es eliminar las células infectadas por los mismos.

Los linfocitos T son células esféricas, con un núcleo grande que ocupa la mayor parte de la célula y relega al citoplasma a una pequeña proporción de material que lo rodea. Los distintos tipos de linfocitos se diferencian en sus funciones, pero son indistinguibles desde el punto de vista morfológico y sólo pueden identificarse por la expresión de las proteínas y receptores presentes en su superficie, expresando todos en superficie el receptor para el antígeno de células T asociado a las cadenas invariantes de CD3 (TCR). Los precursores de los linfocitos se originan en la médula ósea y viajan al timo para completar su diferenciación.

Existen dos tipos de linfocitos T: los linfocitos T colaboradores (“helper”), positivos para la expresión de la molécula CD4 en su membrana; y los linfocitos T citotóxicos, positivos para la expresión de la molécula CD8.

1.2. La sinapsis inmunológica

La activación de la célula T requiere el reconocimiento de un antígeno presentado por una célula presentadora de antígeno (APC) en el contexto del complejo principal de histocompatibilidad (MHC). En un primer momento, la célula T contacta con la APC a través de moléculas de adhesión tipo LFA-1 o ICAM-3. Sirviéndose del TCR, rastrea la superficie de la célula presentadora en busca de un antígeno que pueda ser reconocido por el TCR. En el caso de reconocimiento, la célula T polariza ciertos receptores, compartimentos y moléculas de membrana hacia la zona de contacto, haciendo que la unión entre célula T-APC se haga estable. A esta unión formada en la zona de contacto entre ambas células se le da el nombre de sinapsis inmunológica (SI), por homología con las uniones que se establecen entre las neuronas.

Las moléculas presentes en la SI se organizan en una estructura ordenada denominada

complejo supramolecular de activación (SMAC). Se observó además que las moléculas esenciales para la activación segregaban en partes muy concretas del SMAC (Monks, C.R. *et al.*, 1998). El complejo TCR/CD3 y la PKC- θ quedan agrupados y confinados en una zona central ó cSMAC, rodeados de moléculas de adhesión, como LFA-1, y proteínas del citoesqueleto de actina, como la talina, que forman un anillo concéntrico, periférico ó pSMAC que rodea al cSMAC. Ciertas proteínas transmembrana grandes (CD45 y CD43) y proteínas de citoesqueleto se quedan excluidas de la zona de contacto definiendo una parte más distal ó dSMAC (Figura 1.1), (Huppa, J.B. y Davis, M.M., 2003). De forma simultánea a la formación de la SI, se produce un movimiento del centrosoma y de los orgánulos asociados al mismo para situarse justo enfrente de la SI, posicionando los compartimentos endocíticos y exocíticos frente a la SI.

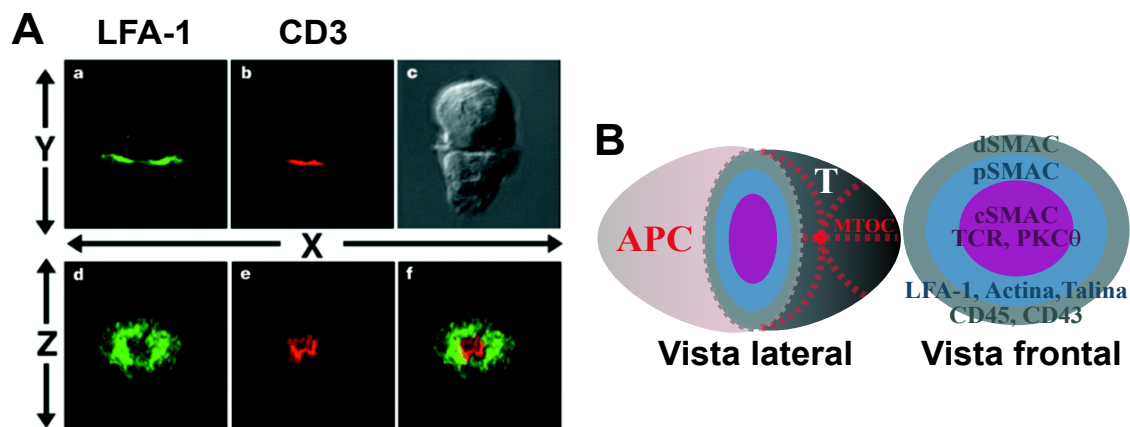


Figura 1.1. Organización de la sinapsis inmunológica en el SMAC. (A) Vista de un plano lateral de la SI (paneles superiores), CD3 se localiza en el cSMAC rodeado de LFA-1, que se encuentra en el pSMAC; reconstrucción de la vista frontal de la SI (paneles inferiores). Imagen tomada de (Monks, C.R. et al., 1998). (B) Esquema de la organización del SMAC.

-¿Cuál es la función de la sinapsis inmunológica?

En el caso de las células T citotóxicas, es lógico pensar que la sinapsis juegue un papel “orientativo” o de direccionalidad, es decir, indicando a la célula T hacia dónde debe polarizar las vesículas citolíticas destinadas a la eliminación de la célula infectada, a la que permanece unida establemente gracias a la formación de la SI. También estaría implicada en la regulación de la terminación de la respuesta citolítica (Stinchcombe, J.C. y Griffiths, G.M., 2003). Las células T colaboradoras secretan IL-2 y citoquinas hacia la SI, y esta sinapsis es estable varios días, durante este tiempo ocurren de 3-4 divisiones celulares. Aunque la sinapsis no es estrictamente requerida para la proliferación celular ayuda a regular el proceso.

Otra función propuesta para la sinapsis es la de ser el lugar donde se induce el proceso que conduce a la degradación del TCR (Lee, K.H. *et al.*, 2003) y de otras moléculas implicadas en señalización. En el caso del TCR, este complejo es internado en vesículas recubiertas de clatrina y es degradado por el lisosoma o por el proteasoma. La proteína adaptadora LAT también

sufre internación, pero parece que no se asocia a clatrina, sino a balsas lipídicas (Barr, V.A. *et al.*, 2006).

1.3 Las balsas de membrana en la activación del linfocito T

Según el modelo clásico del “mosaico fluido”, las membranas son consideradas como una mera barrera lipídica uniforme y con difusión libre que separan dos medios acuosos de diferente composición: el citosol y el medio extracelular. Este modelo ha ido variando teniendo en cuenta, por una parte, las diferentes propiedades físicoquímicas de los lípidos (Brown, D.A. y London, E., 1997) y su distribución asimétrica en las dos hemimembranas.

Las membranas celulares contienen glicerofosfolípidos, glicosfingolípidos y esteroides (en vertebrados, principalmente colesterol). El hecho de que los glicosfingolípidos tiendan a asociarse entre sí y que estas asociaciones sean incluso más fuertes en presencia de colesterol, llevó a sugerir un modelo en el que la membrana presentaría en general una estructura desordenada, formada por los fosfolípidos insaturados en la que se incluirían, a modo de “balsas”, microdominios de estructura más ordenada, ricos en glicosfingolípidos y colesterol, denominados balsas de membrana. Debido a su compactación las balsas de membrana pueden ser aisladas en una fracción de membranas insolubles en detergentes (DRMs o detergent-resistant membranes) (Simons, K. y Wandinger-Ness, A., 1990).

Existen ciertas proteínas que, bien por su hidrofobicidad o bien por sus modificaciones postraduccionales, (acilaciones, asociación a grupos glicosilfosfatidilinositol (GPI), etc.), se enriquecen en las balsas lipídicas. Se ha postulado que alguna de estas proteínas podría actuar como plataformas o “andamios”, formándose oligómeros que aumentarían la afinidad por ciertos lípidos, creándose microdominios lipídicos. La estructura lípido-proteica de estos microdominios puede ser considerada como una plataforma que agrupa a determinadas proteínas de membrana, que puede regular su afinidad por sus ligandos, y compartimentalizarlas en estructuras distinguibles o no morfológicamente. Entre las familias de proteínas que organizan los microdominios de membrana se encuentran las caveolinas, flotilinas, anexinas y proteínas con dominios MARVEL (Sanchez-Pulido, L. *et al.*, 2002).

Una serie de artículos independientes describían a finales de la década pasada que tras la activación de los linfocitos T, el TCR y una serie de receptores de membrana y moléculas señalizadoras eran incluidos en la fracción de las balsas lipídicas (Alonso, M.A. y Millan, J., 2001). Esta observación permitió proponer la hipótesis de que la estimulación induce la agregación de las balsas y el ensamblaje de la maquinaria de señalización (Montixi, C. *et al.*, 1998; Xavier, R. *et al.*, 1998; Zhang, W. *et al.*, 1998). Ese sería un proceso dinámico de entrada-salida de componentes de las balsas, de tal manera que estos microdominios compartimentalicen a quinasas/fosfatasa y sus sustratos, haciéndolos accesibles a unas y apartándolos de las otras.

Además de las moléculas cuya presencia en las balsas es inducida tras la estimulación celular, otras proteínas del linfocito T se encuentran de forma constitutiva en células en reposo en este tipo de membranas. De entre estas moléculas, las más importantes son la tirosina quinasa Lck y la proteína adaptadora LAT (Fig.1.2).

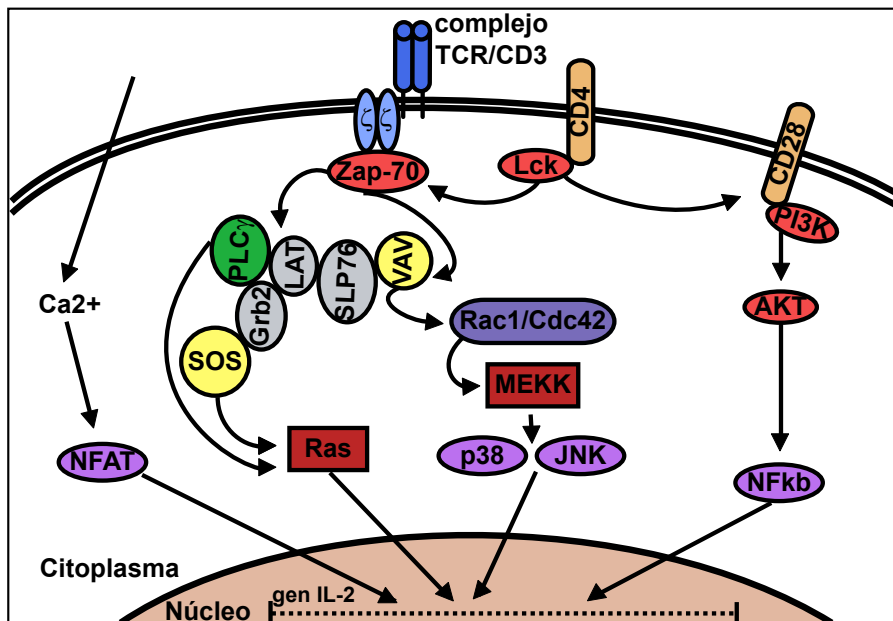


Figura 1.2. Rutas de señalización durante la activación del linfocito T. En esta imagen se muestra un esquema de algunas rutas de señalización que tienen lugar en el linfocito T cuando se produce el reconocimiento antigénico. Estas rutas desembocan en la expresión del gen de la IL-2 y en la proliferación celular.

1.4 La proteína Lck

Lck es una tirosina quinasa de la familia Src que juega un papel crucial durante los eventos tempranos de la señalización en el linfocito T. El dominio amino terminal presenta señales de acilación. Así, la glicina en posición 2 es modificada mediante la adición de una molécula de ácido mirístico y las cisteínas 3 y 5, de un resto de ácido palmítico cada una. Gracias a estos anclajes lipídicos, la proteína se asocia a la cara interna de la membrana plasmática (Shenoy-Scaria, A.M. *et al.*, 1993; Rodgers, W. *et al.*, 1994; Kabouridis, P.S. *et al.*, 1997). Lck presenta también un dominio SH3, un dominio SH2 y un dominio catalítico con actividad quinasa (Fig. 1.3. A).

La actividad de Lck está regulada por la fosforilación de dos residuos de tirosina importantes, uno localizado en el dominio catalítico de la proteína y otro en el extremo carboxilo terminal. La tirosina del extremo carboxilo terminal (Y505 en humanos), cuando está fosforilada, interacciona con el dominio SH2 de la molécula, haciendo que la proteína se encuentre en una conformación plegada y de baja actividad. La conversión entre la forma cerrada y abierta de la proteína está regulada por la acción de otras proteínas: la quinasa Csk fosforila la Y505 e inhibe la actividad de Lck (Bergman, M. *et al.*, 1992), mientras que la fosfatasa CD45 defosforila esa misma tirosina para favorecer la conformación abierta (Penninger, J.M. *et al.*, 2001). La autofosforilación de la tirosina del dominio catalítico (Y394), hace que la proteína adquiera una mayor actividad (Yamaguchi, H. y Hendrickson, W.A., 1996) (Fig. 1.3. B). La actividad de Lck está relacionada con la transducción de la señal a través del TCR ya que la Lck fosforila a los ITAM (immunoreceptor tyrosine activation motifs) en la cadena de CD3 ζ , que sirven de anclaje para ZAP-70, que a su vez fosforila otros sustratos como LAT que servirá de anclaje para Grb2, PI3K y fosfolipasa C γ 1. La cascada de fosforilación iniciada por la Lck culmina en la movilización intracelular de ion calcio (Ca^{2+}) y la activación de importantes cascadas de señalización, que incluyen la vía Ras, que se resulta en la activación de ciertos factores de transcripción como NFAT, NF κ B y AP-1. Estos

factores de transcripción regulan la expresión del gen de la IL-2.

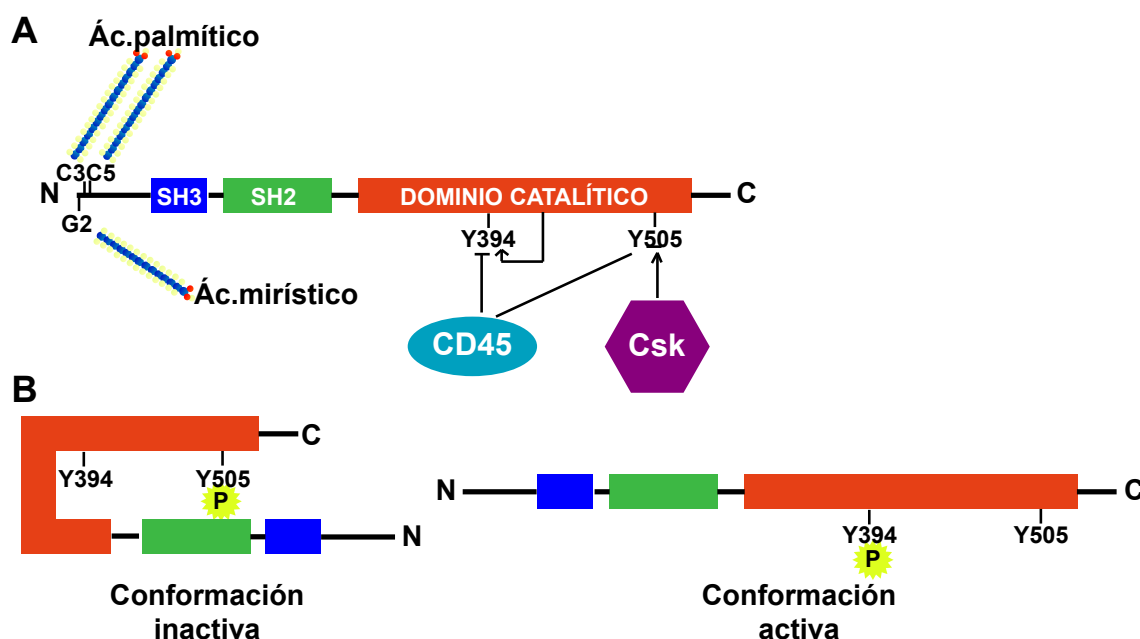


Figura 1.3. Estructura y regulación de la proteína Lck. (A) Lck presenta un dominio SH3, un dominio SH2 y un dominio catalítico con actividad tirosina quinasa. En su extremo amino terminal presenta tres residuos acilables. La regulación de la quinasa viene dada por la fosforilación de dos residuos clave, las tirosinas, Y394 y Y505. La quinasa Csk es la responsable de la fosforilación de la Y505, mientras que el grupo fosfato de la Y394 se añade por autofosforilación. La fosfatasa CD45 es la responsable de la defosforilación de ambos residuos. (B) En la conformación inactiva, la Y505 fosforilada interacciona con el dominio SH2 de la propia Lck y hace que la molécula adquiera una conformación cerrada, dejando el dominio catalítico inaccesible a sus sustratos. Cuando CD45 defosforila a la Y505, la molécula se abre y se autofosforila en la Y394, adquiriendo su conformación activa.

Para ejercer su función en el linfocito T, Lck necesita localizarse en la membrana plasmática a la que se asocia por su cara interna, citoplásmica, a través de los restos de mirístico y palmítico unidos covalentemente a su extremo amino terminal. Además de en la membrana plasmática, Lck está presente también en endosomas de reciclaje con localización pericentrosomal. En células Jurkat, aproximadamente un 50% de Lck es detectado en la fracción de balsas lipídicas en las que también cofracciona MAL (Anton, O. *et al.*, 2008). De hecho, MAL y Lck han sido detectadas en balsas de membrana obtenidas de una fracción endosomal (Millan, J. y Alonso, M.A., 1998). Las modificaciones lipídicas de Lck son necesarias para la inclusión de la molécula en la fracción de balsas de membrana. La inclusión de Lck en las balsas es necesaria para su capacidad de fosforilar las cadenas CD3 del complejo TCR/CD3 (Kabouridis, P.S. *et al.*, 1997).

Lck es transportada a la membrana plasmática utilizando la ruta exocítica (Bijlmakers, M.J. y Marsh, M., 1999) y su niveles en la misma pueden ser regulados por ciclos de acilación-deacilación (Zimmermann, L. *et al.*, 2009). La proteína Unc119 ha sido implicada en el control del tráfico de Lck hacia membrana plasmática en un proceso todavía no muy esclarecido en el que intervienen también la GTPasa Rab11 y el citoesqueleto de actina (Gorska, M.M. *et al.*, 2009).

1.5 Transporte vesicular en linfocitos T

El transporte vesicular en el linfocito T en reposo ha sido poco estudiado. Aunque tampoco son muy abundantes, existen más estudios de tráfico vesicular en el linfocito activado bien con anticuerpos o con células presentadoras de antígeno. De esta manera, se observó que los compartimentos exo/endocíticos se reorientan hacia la zona de la SI, de forma paralela a la reorientación del centrosoma.

En el caso de los linfocitos T citolíticos se observó que la secreción de los gránulos líticos (que contienen perforinas y granzimas) a la célula infectada se realiza desde el centrosoma. En estas circunstancias, el centrosoma aparece contactando con la membrana plasmática y se distribuye de manera polarizada hacia la SI. El centrosoma se yuxtapone al cSMAC, que se liberaría de la actina subcortical para permitir la liberación del contenido de los gránulos (Stinchcombe, J.C. *et al.*, 2006).

También en el caso de conjugados entre linfocitos T y células presentadoras se ha descrito la existencia de un tráfico vectorial hacia la SI (Batista, A. *et al.*, 2004; Das, V. *et al.*, 2004). Estos estudios muestran que, tras la activación, el TCR y otras moléculas de superficie como el receptor de transferrina (TfR) se concentran rápidamente en la zona de la SI tras sufrir un proceso de endocitosis y reciclaje polarizado (Fig. 1.4).

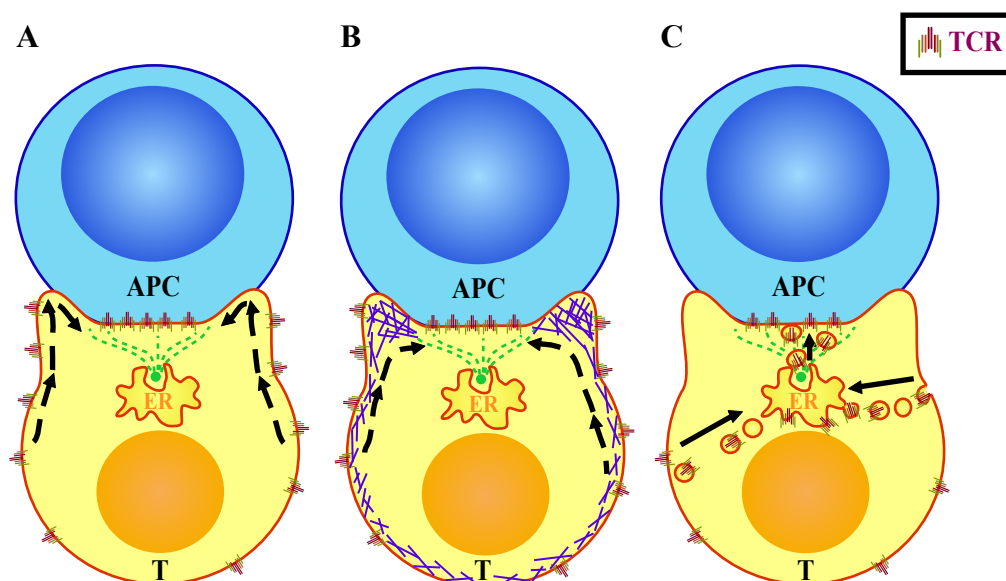


Figura 1.4. Transporte de proteínas a la SI en linfocitos T. Vías propuestas: (A) Difusión de proteínas por la membrana. (B) Transporte asociado a proteínas del citoesqueleto. (C) Endocitosis de la proteína y reciclaje polarizado a la SI. Para el TCR se ha propuesto la vía C, las vesículas de endocitosis alcanzarían el complejo de reciclaje (ER), desde donde una parte del TCR sería reciclado a membrana plasmática. Al producirse el reconocimiento antigénico, este reciclaje se haría de forma polarizada a la SI.

En el caso de otras moléculas que se polarizan a la SI, como son Lck y LAT, parece que hay dos reservorios distintos: uno que viaja por difusión a través de la membrana hacia la sinapsis, muy posiblemente por balsas lipídicas, y otro asociado a estructuras exocíticas que es transportado

una vez establecida la sinapsis de manera direccionada hacia el contacto (Ehrlich, L.I. *et al.*, 2002; Bonello, G. *et al.*, 2004).

Otro tipo de transporte especializado ocurre durante el ``apagado`` de la señal establecida al inicio de la S.I. En este caso, el TCR acumulado en la zona de contacto sufre endocitosis, lo que hace que deje de transmitir señales, y, en vez de ser reciclado a la superficie, es conducido a la ruta degradativa. Para este mecanismo, parece ser esencial la clatrina, que podría tener también un papel en la conducción de los complejos de TCR endocitados hacia el lisosoma (Crotzer, V.L. *et al.*, 2004).

1.6 Reorganización del citoesqueleto durante la formación de la sinapsis inmunológica

-El citoesqueleto de actina.

El citoesqueleto de actina participa de forma importante en la activación del linfocito T, llevando a cabo dos procesos críticos: 1) el desarrollo de cambios en la forma de la célula para favorecer el movimiento celular, siendo importante en la formación y estabilización de la SI, 2) servir de plataforma para las moléculas de señalización durante la activación de la célula T, pudiendo reclutar y estabilizar dominios de membrana. (Dustin, M.L. y Cooper, J.A., 2000).

Al contactar un linfocito T con una APC, el citoesqueleto de actina se polariza rápidamente hacia la zona de sinapsis que adopta una forma de lamelipodio que abraza a la célula presentadora (Bunnell, S.C. *et al.*, 2001).

-El centrosoma

En células epiteliales y en macrófagos en migración, el centrosoma se localiza entre el núcleo y el frente de avance. Durante el reconocimiento de antígeno por parte del linfocito T se produce una reorientación equivalente del centrosoma (Kupfer, A. y Dennert, G., 1984) (Fig. 1.5). Esta recolocalización constituye otro de los hitos del proceso de polarización del linfocito T y es necesaria para que tenga lugar con normalidad el proceso de señalización promovido por el TCR (Miletic, A.V. *et al.*, 2003; Martin-Cofreces, N.B. *et al.*, 2008) y permite la colocación de los compartimentos endocítico y secretor frente a la SI. Una vez reorientados, desde estos compartimentos tiene lugar la liberación de gránulos secretores para matar a las células diana en el caso de los linfocitos T citotóxicos (Stinchcombe, J.C. *et al.*, 2006), así como la translocación de proteínas de membrana como LAT y de moléculas señalizadoras como Lck. Además de Lck, ZAP-70, LAT, SLP-76, ADAP, Fyn, SALP130 y CD2AP, se ha descrito el requerimiento del complejo dineína-dinactina en la reorientación del centrosoma (Combs, J. *et al.*, 2006; Martin-Cofreces, N.B. *et al.*, 2006). A pesar del considerable avance en la identificación de los requerimientos para que tenga lugar este proceso, todavía se desconoce el mecanismo molecular responsable de la movilización del centrosoma al contacto.

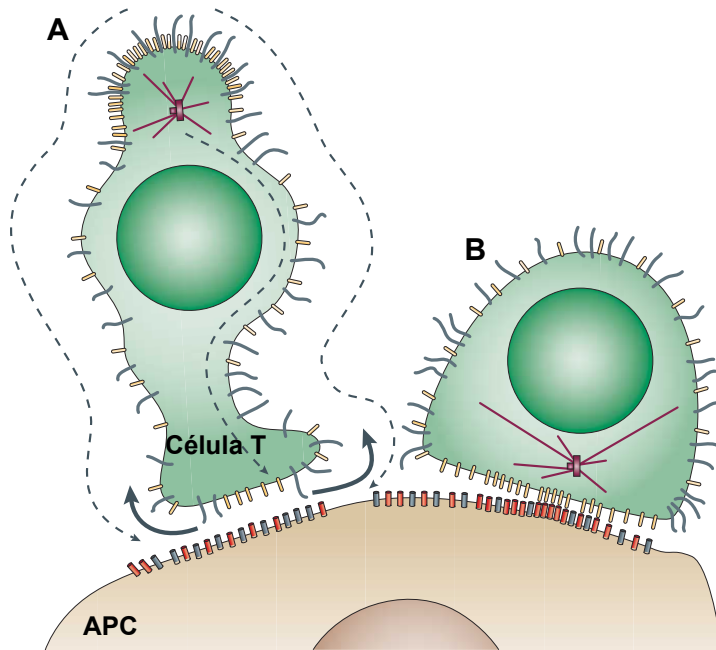


Figura 1.5. Cambios morfológicos y del citoesqueleto durante la formación de una SI. Tras la activación del TCR, la célula T detiene su migración (A) y el centrosoma se reorienta desde el urópodo hasta contactar con la sinapsis inmunológica (B). Las moléculas de TCR, en amarillo, son reclutadas a la sinapsis. Imagen tomada de (Huppa, J.B. y Davis, M.M., 2003).

Del centrosoma, una vez posicionado en la zona de contacto, parten una serie de microtúbulos que llegan hasta la sinapsis, anclándose a la membrana y definiendo una zona circular que se corresponde con el pSMAC, aunque también se anclan al cSMAC. Las vesículas de transporte usan estos haces de microtúbulos con forma de cono (Kuhn, J.R. y Poenie, M., 2002) para dirigirse al cSMAC recorriendo los microtúbulos desde su extremo (+) a su extremo (-) y posteriormente secretar direccionalmente las proteínas de la carga hacia el cSMAC (Stinchcombe, J.C. *et al.*, 2006). La unión con el pSMAC parece producirse a través de la proteína adaptadora ADAP, que une dineína. La falta de la proteína ADAP lleva a un defecto en la polarización del centrosoma hacia la SI (Combs, J. *et al.*, 2006) porque en situación normal la dineína generaría tensión sobre los microtúbulos favoreciendo el movimiento centrosomal. La proteína adaptadora IQGAP1 que forma parte del complejo del extremo + de los microtúbulos, y los anclan a la actina subcortical, también ayudaría a generar las fuerzas de tensión necesarias para el movimiento del centrosoma (Stinchcombe, J.C. *et al.*, 2006; Brandt, D.T. *et al.*, 2007).

-Las GTPasas de la familia Rho y su implicación en la formación de la SI

En mamíferos existen más de 20 proteínas GTPasas de la familia Rho. Estas GTPasas cumplen un papel importante en la regulación del citoesqueleto de actina (Fig. 1.6.A). Las RhoGTPasas ciclan entre un estado activo, unidas a GTP, y un estado inactivo, unidas a GDP. En estado activo interaccionan con sus efectores. El dinamismo entre los dos estados está regulado por tres grupos de proteínas; GEF (guanine nucleotide exchange factor), que catalizan la reacción del cambio nucleotídico, GAP (GTPase activating protein), que estimulan la hidrólisis del GTP, y GDI (guanine nucleotide dissociation inhibitors), cuya función consiste en extraer a las GTPasas inactivas de membranas y mantenerlas en un estado inactivo (Fig. 1.6.C). Todas las GTPasas están preniladas en su región carboxilo terminal (CAAX box) (Fig. 1.6.B), lo que es importante para su

unión a membranas y su función.

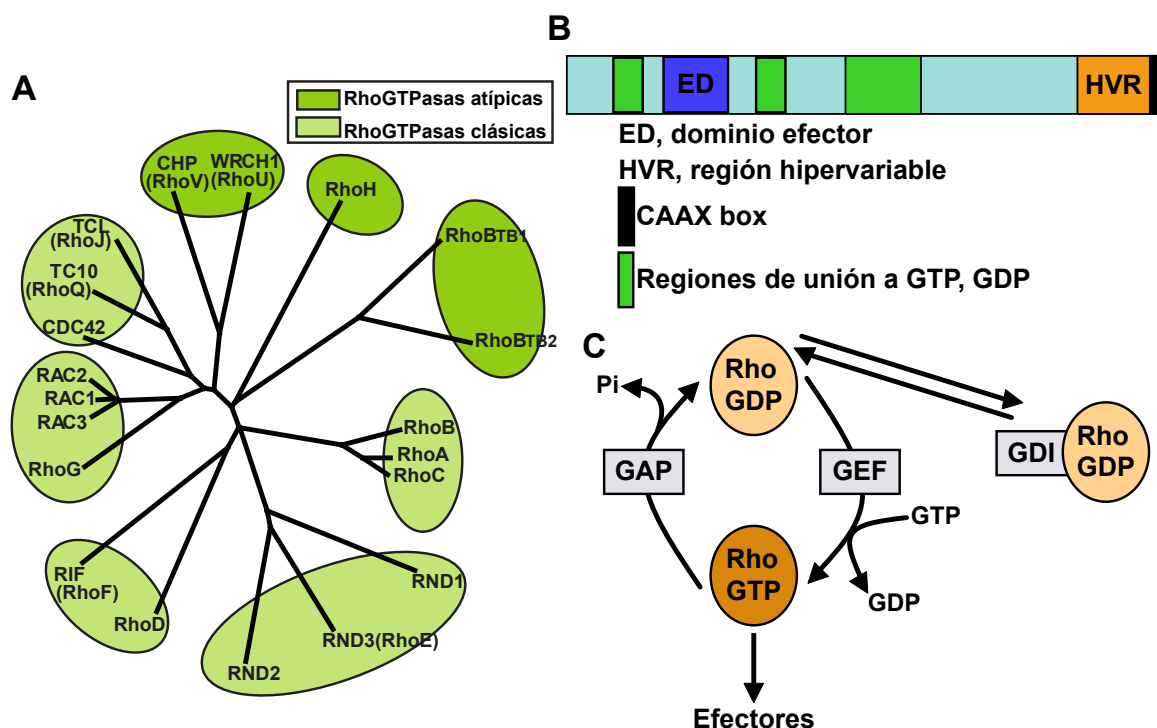


Figura 1.6. La familia de las RhoGTPasas. (A) Árbol filogenético de 20 proteínas GTPasas. Imagen tomada de (Heasman, S.J. y Ridley, A.J., 2008). (B) Esquema de la estructura de las RhoGTPasas A-D. (C) Ciclo de las RhoGTPasas.

En el linfocito T y también en otros tipos celulares, una de las funciones principales de las RhoGTPasas es la de regular la dinámica de actina y de microtúbulos. Así, durante el proceso de formación de la SI, la proteína vav1, que es una GEF de Rac1 y Cdc42, activa a estas Rho GTPasas. Esto hace que Cdc42 o Rac1 una vez activados se unan a proteínas WASP o WAVE, respectivamente, e induzcan la polimerización de actina en la SI a través de la activación del complejo Arp2/3, que nuclea la formación de filamentos de actina ramificados.

Por otro lado, las RhoGTPasas también regulan la reorientación del centrosoma a la SI. Así, este proceso resulta bloqueado por la expresión en linfocitos T de formas constitutivamente activas o dominantes negativas de Cdc42 (Stowers, L. *et al.*, 1995). Sin embargo, un trabajo más reciente realizado utilizando shRNA para silenciar Cdc42 y Rac1 implica a la GTPasa Rac1 y no a Cdc42 en control de la reorientación del centrosoma (Gomez, T.S. *et al.*, 2007).

1.7 La línea celular Jurkat

La línea celular Jurkat fue generada a partir de linfocitos de sangre periférica (PBLs) de un niño de catorce años con leucemia T (Schneider, U. y Schwenk, H.U., 1977). Se demostró que era positiva para marcadores de células T, y posteriormente, se validó como modelo de célula T por su capacidad de producción de IL-2 tras su estimulación con fitohemaglutinina o concanavalina A. En el laboratorio del Dr. A. Weiss (Howard Hughes Medical Institute, University of California San

Francisco, USA) se aisló el clon Jurkat E6.1 que ha sido la células modelo más utilizadas para el estudio del proceso de activación del linfocito T.

En comparación con un linfocito T primario, las células Jurkat son deficientes en la expresión de las fosfatasa lipídicas PTEN y SHIP, por lo que estas células presentan un nivel elevado de activación de la PI3K debido a los altos niveles de PI(3,4,5)P(3) incluso cuando no están activadas. Esta deficiencia hace que los resultados obtenidos en esta línea celular tengan que ser siempre corroborados con células T primarias.

2. MAL

2.1 La proteína MAL

El gen *MAL* fue aislado durante una búsqueda de genes que se expresaban de forma diferencial a lo largo del desarrollo del linfocito T humano (Alonso, M.A. y Weissman, S.M., 1987).

MAL es el miembro fundador de la familia MAL de proteínas, que consta de 8 miembros: MAL, MAL-2, BENE, la subfamilia MYADM (MYADM, MYADM-L, MYADM-S), plasmolipina (PLLP) y PLLP2, que comparten una serie de características comunes. El análisis bioinformático de las secuencias aminoacídicas de estas proteínas ha permitido definir un motivo denominado MARVEL (MAL and related proteins for vesicle trafficking and membrane link), presente en todos los miembros de la familia MAL y en otras familias de proteínas (sinaptofisinas, sinaptogirinas, ocludina) cuya función ha sido relacionada con procesos de yuxtaposición/fusión de membranas y/o tráfico intracelular de proteínas (Sanchez-Pulido, L. *et al.*, 2002).

MAL es una proteína integral de membrana, no glicosilada, de 17 kDa. El perfil de hidrofobicidad para su secuencia aminoacídica predice cuatro segmentos transmembrana, conectados entre sí por bucles hidrofílicos cortos. Sus extremos amino y carboxilo terminales quedan expuestos hacia el citoplasma. La característica bioquímica más relevante de la proteína MAL es su alta hidrofobicidad. Así, la molécula MAL es, como el resto de los miembros de la familia MAL hasta hoy estudiados, fracciona de forma selectiva en las balsas lipídicas. La proteína MAL se expresa no sólo en linfocitos T, donde inicialmente se identificó, sino también en las células epiteliales polarizadas, como la línea celular MDCK, oligodendrocitos y células de Schwann (Fig. 1.7).

2.2 Función de MAL en células epiteliales polarizadas

La característica fundamental de las células epiteliales es que presentan dos zonas de la membrana bien diferenciadas morfológica y funcionalmente: la membrana apical y la basolateral. Las observaciones de que: 1) la membrana apical está enriquecida en glicoesfingolípidos, 2) los glicoesfingolípidos tienden a autoasociarse y formar agrupaciones insolubles en detergente, y 3) algunas proteínas apicales como la hemaglutinina del virus de la gripe son insolubles durante

su transporte biosintético hacia la membrana, llevaron a postular un modelo, según el cual los glicosfingolípidos se agruparían en la red del *trans*-Golgi y actuarían como plataformas para la inclusión específica de proteínas destinadas a ser transportadas hacia la superficie apical (Simons, K. y Wandinger-Ness, A., 1990). El transporte de las proteínas basolaterales tendría lugar mediante interacciones proteína-proteína entre señales peptídicas presentes en su tallo citoplásmico y adaptadores de cubiertas vesiculares, y no podrían acceder a estos microdominios, siendo por lo tanto excluidas de las vesículas con destino hacia la superficie apical. Se postuló hace años que, de forma similar al transporte basolateral, se necesitaría una maquinaria proteica especializada para el transporte apical cuya función sería captar moléculas carga, interactuar con la membrana receptora y fusionar las vesículas con la membrana apical.

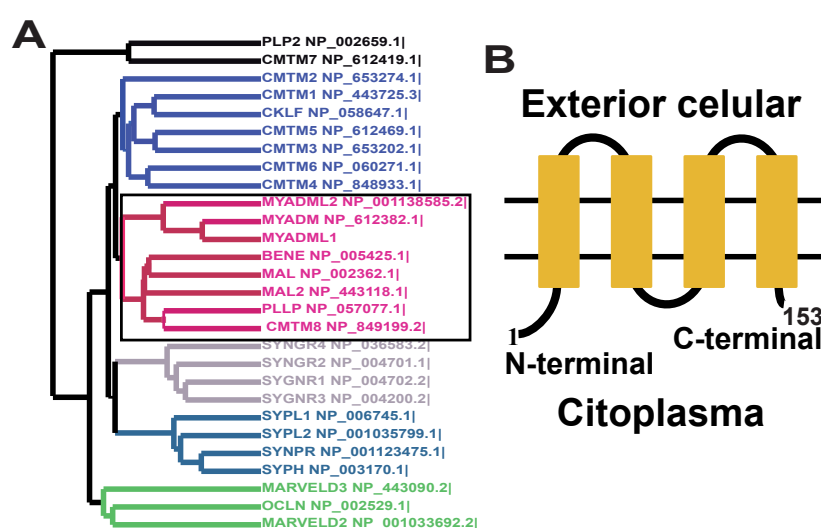


Figura 1.7. La familia MAL de proteínas. (A) Árbol filogenético de la superfamilia de proteínas con dominios MARVEL. La familia MAL de proteínas se encuentra encuadrada. (B) Esquema de la estructura propuesta para la proteína MAL.

Los trabajos realizados en nuestro laboratorio, entre otros, han demostrado un papel esencial de la proteína MAL como integrante de la maquinaria para el tráfico a la membrana apical directo (Cheong, K.H. *et al.*, 1999; Puertollano, R. *et al.*, 1999; Martín-Belmonte, F. *et al.*, 2000). En células MDCK con niveles reducidos de proteína MAL, el transporte apical se paraliza y la carga queda retenida intracelularmente. Este bloqueo se correlaciona estrictamente con un impedimento de las proteínas cargo a asociarse con los DRMs. Estudios posteriores demuestran que MAL es una molécula dinámica que circula entre el aparato de Golgi, donde recoge la carga, y la membrana plasmática, donde la entrega (Puertollano, R. y Alonso, M.A., 1999).

Otro miembro de la familia, no presente en linfocitos, MAL2, se ha descrito como un elemento esencial de la maquinaria para el tráfico transcitótico desde la zona basolateral a la apical en células hepáticas (de Marco, M.C. *et al.*, 2002) (Fig. 1.8).

2.3 MAL en los linfocitos T

Los estudios llevados a cabo en nuestro laboratorio establecieron que MAL está enriquecida en las balsas de membrana en linfocitos T humanos (Millan, J. *et al.*, 1997) junto con la quinasa Lck y otras proteínas asociadas a estos microdominios, como la proteína anclada por GPI CD59.

En el linfocito T en reposo, la proteína MAL aparece en endosomas de reciclaje, y en linfocitos migrando aparece en el cuello del urópodo (Millan, J. *et al.*, 2002)

La función de MAL en linfocitos T está relacionada con el tráfico de Lck a membrana plasmática (Anton, O. *et al.*, 2008). Los estudios se realizaron en una mutante carente de MAL (JTIM) derivado de células Jurkat en el que se observó que el TCR, Lck, PKC- θ y el centrosoma no se polarizaban hacia la SI. Se observó que, en estado estacionario, la proteína Lck quedaba retenida en un compartimento intracelular en las células carentes de MAL y apenas podía ser detectada en la membrana plasmática. Mediante experimentos de coimmunoprecipitación se observó asociación de MAL con Lck, resultado que era congruente con el grado alto de colocalización de ambas proteínas. Por experimentos de videomicroscopía se observó que MAL y Lck viajaban en las mismas vesículas de transporte hacia la membrana plasmática desde el compartimento pericentriolar, y que la formación de dichas vesículas era estrictamente dependiente de la expresión de MAL (Fig. 1.9).

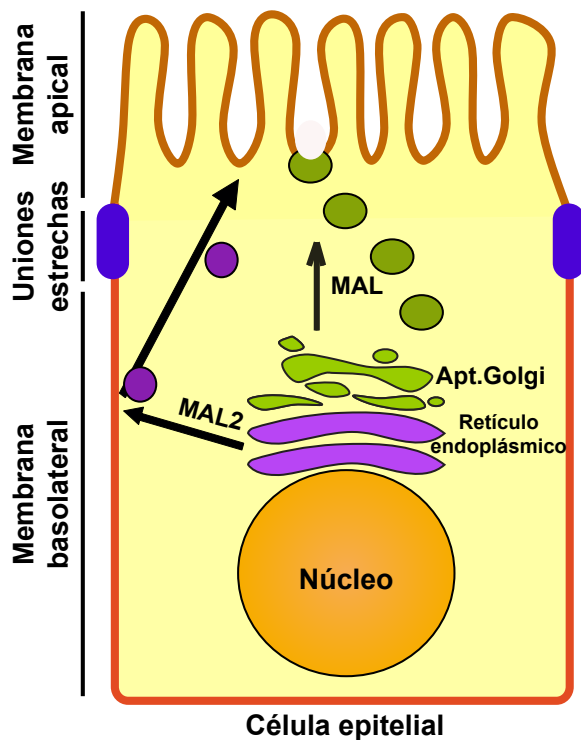


Figura 1.8. Esquema del transporte mediado por MAL, transporte apical directo, y MAL2, transcitosis, en células epiteliales polarizadas.

El hecho de que en ausencia de expresión de MAL no se formaran las vesículas de transporte se correlacionó con la observación de que la proteína Lck era excluida mayoritariamente de la fracción enriquecida en balsas de membrana en las células carentes de MAL, mientras que sí accedía a estas membranas en las células parentales. Esta observación recordaba los resultados obtenidos en células epiteliales donde se observó que tanto el transporte de HA a la superficie apical como la inclusión de HA en las fracciones enriquecidas en las balsas eran defectivas en las células MDCK silenciadas para la expresión de MAL (Puertollano, R. *et al.*, 1999). Este paralelismo llevó a proponer un modelo según el cual MAL por un lado organizaría a los lípidos para generar

balsas de membrana competentes en la captación de Lck y, por otro, actuaría en el propio proceso de formación de las vesículas de transporte, tal y como había sido postulado anteriormente para el transporte de HA a la superficie apical.

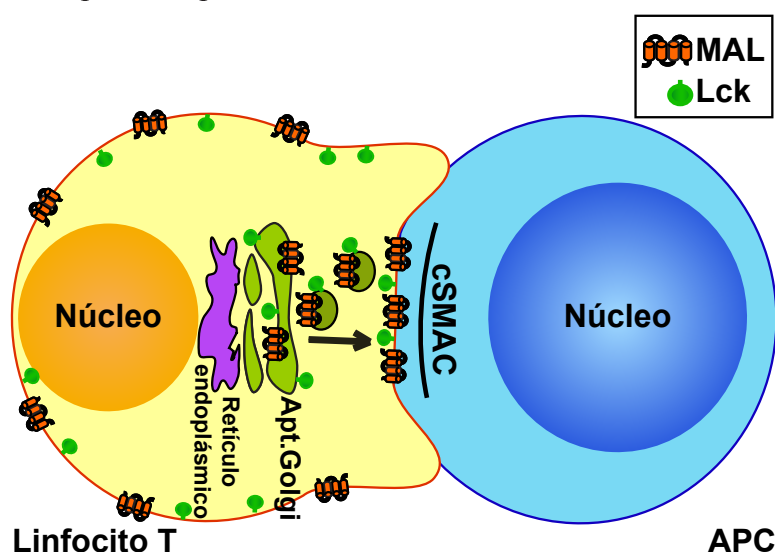


Figura 1.9. Esquema del transporte de Lck hacia el cSMAC en la SI, mediado por MAL, en linfocitos T.

Trabajos previos realizados por otros grupos pusieron de manifiesto que la expresión de Lck en la membrana plasmática era esencial para la formación de la IS y la activación de las rutas de señalización promovidas por el TCR. Por lo tanto, era lógico pensar que la expresión reducida de Lck en la membrana plasmática observada en el mutante carente de MAL podría ser la causa principal de los defectos observados en la formación de la IS. Mediante la expresión forzada de Lck en la membrana con una quimera de CD4 y Lck (ectodominio y región transmembrana de CD4 fusionada en su parte citoplásmica con Lck) se observó la restauración de una parte de los defectos encontrados en el mutante como por ejemplo la translocación del TCR, mientras que otros procesos como la reorientación del centrosoma o la señalización por el TCR seguían siendo defectuosos. Por el contrario, la re-expresión de MAL reparó todas las anomalías encontradas en el mutante. Esto indicó que, aunque la falta de expresión de Lck es una de las causas principales de los defectos observados en el mutante carente de MAL, MAL lleva a cabo en el linfocito T otras funciones además de transportar Lck a la membrana plasmática.

3. INF2

3.1 Las forminas

Las forminas son una familia de proteínas que se expresan en casi todos los tipos celulares y que ejercen funciones importantes en la organización y regulación del citoesqueleto de actina y de microtúbulos durante la meiosis, mitosis, mantenimiento de la polaridad celular, tráfico vesicular, señalización hacia el núcleo y desarrollo embrionario, entre otros.

Existen siete subfamilias de forminas que difieren en su estructura y regulación. La subfamilia más estudiada de las forminas es la Drf (Diaphanous-related formins), que se caracteriza por su capacidad de unirse a miembros de la familia de las RhoGTPasas en un estado activo unido a GTP y ser regulada por ellas (Goode, B.L. y Eck, M.J., 2007). La RhoGTPasa interacciona con el dominio llamado GBD (GTPase binding domain) que se encuentra en el extremo amino terminal de las Drf. Los GBD presentan afinidad selectiva por ciertas RhoGTPasas lo que confiere a cada Drf una regulación específica. En el caso de la formina mDial asociada a RhoC, los estudios de cristalización han demostrado que la formina se une a la RhoGTPasa por dos regiones una denominada región G y otra que corresponde con el extremo amino terminal de un dominio adyacente conocido como DID (Diaphanous inhibitory domain) que contiene varias repeticiones de tipo armadillo. La región G interacciona con el “interruptor 1” de la RhoC, mientras que el DID lo hace con el “interruptor 2” (Rose, R. *et al.*, 2005). Las forminas Drf en estado estacionario se encuentran inactivadas por autoinhibición en una conformación cerrada debida a la interacción del DID con un dominio denominado DAD (Diaphanous autoregulatory domain), situado en una zona carboxilo-terminal (Wallar, B.J. *et al.*, 2006). La activación de la formina se debe a la unión de la RhoGTPasa correspondiente con el GBD que libera la interacción del DID con el DAD abriendo la molécula y exponiendo al exterior el resto de sus dominios. Es posible generar formas constitutivamente activas de las Drfs mediante la eliminación del GBD o del DAD que imposibilita que la Drf adopte su forma cerrada inactiva (Fig. 1.10).

Además de los dominios citados implicados en su regulación, las Drfs presentan otros dominios denominados FH2 (Formin Homology 2) y FH1 implicados en la actividad nucleadora de filamentos de actina (F-actina). El dominio FH2 es el más conservado en las distintas forminas (Higgs, H.N. y Peterson, K.J., 2005) y es suficiente para la nucleación *in vitro* de actina a partir de monómeros de actina purificados. Las regiones FH2 purificadas son capaces de nuclear la formación de F-actina y de asociarse al extremo de crecimiento rápido (“barbed”) de los mismos, permitiendo la inserción de monómeros y protegiendo el final del filamento de su colapso y depolimerización (Kovar, D.R. y Pollard, T.D., 2004; Moseley, J.B. *et al.*, 2004; Zigmond, S.H., 2004). El dominio FH1, adyacente al FH2, contiene secuencias ricas en prolina que interaccionan directamente con profilina. La profilina une G-actina y la suministra para el crecimiento del filamento, y con otras moléculas con dominios de interacción SH3. De esta forma el tándem FH1FH2 polimeriza filamentos de actina de manera acelerada y eficiente. Por último, existen regiones coiled-coil (cc) a ambos lados de los dominios FH que están implicados en la dimerización de las forminas (Krebs, A. *et al.*, 2001).

Una diferencia importante con respecto al complejo nucleador de actina Arp2/3 es que, mientras éste forma filamentos ramificados de actina, las forminas generan filamentos lineales (Evangelista, M. *et al.*, 2003; Ridley, A.J., 2006). La función de taponar (“capping”) el extremo de crecimiento del filamento de actina impide su colapso y despolimerización.

3.2 Las forminas en el tráfico vesicular

El citoesqueleto tiene un papel importante en el tráfico ya que los filamentos de actina regulan la disposición de muchos compartimentos celulares, y la interacción de las vesículas de transporte con los microtúbulos y las proteínas motoras es necesaria para el movimiento vesicular a lo largo de los microtúbulos.

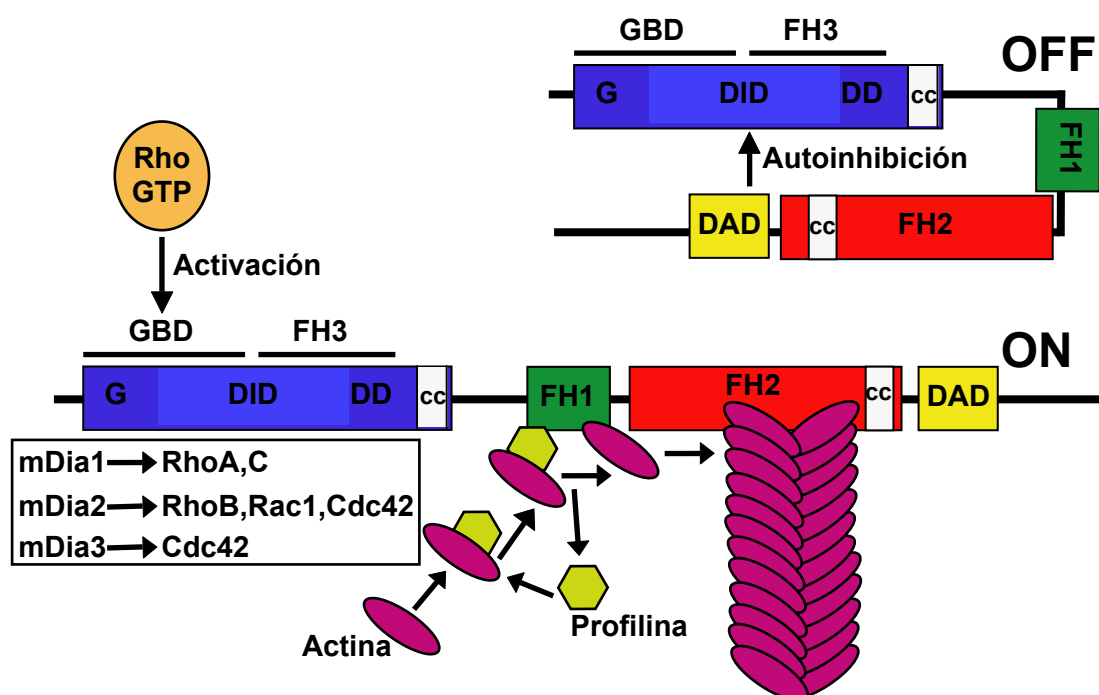


Figura 1.10. Regulación molecular de las forminas Drf. Modelo para la autoinhibición de las forminas de la subfamilia Diaphanous; hDia1/mDia1, hDia2/mDia3, hDia3/mDia2, y de la activación por la forma GTP de la RhoGTPasa correspondiente. La unión de la forma activa de la GTPasa al GBD de la formina, libera la interacción del DID con el DAD y expone los dominios FH1 y FH2 que median la formación de filamentos lineales de actina.

Uno de los ejemplos mejor estudiados de la implicación de las forminas en el tráfico de membranas es el de la Drf: hDia2C, un efector de la GTPasa RhoD. La RhoD activada recluta a la formina desde el citoplasma a endosomas Rab5⁺. Las formas constitutivamente activas de la formina, mimetizan el efecto de RhoD activo sobre la motilidad de los endosomas, disminuyendo su velocidad, y producen un alineamiento del citoesqueleto de actina y de tubulina en el que también se distribuyen las vesículas endosomales. De forma coherente con estas observaciones, el silenciamiento de hDia2C bloquea el movimiento endosomal mediado por RhoD. Por lo tanto, RhoD y hDia2C regularían la motilidad de los endosomas tempranos (Gasman, S. *et al.*, 2003).

La GTPasa RhoB que se localiza en endosomas tempranos y tardíos es necesaria también para el movimiento endosomal. RhoB interacciona con mDia 2 en los endosomas, y la activación de RhoB es necesaria para que mDia2 se localice en los endosomas. La expresión de formas activas o inactivas de mDia2 o de RhoB y el uso de inhibidores que actúan al nivel de la dinámica de la actina producen un bloqueo del tráfico endosomal, lo que indica que es necesario el reciclado dinámico de RhoB y mDia2 entre las formas activas y las inactivas y también de una dinámica

de actina inalterada para que se produzca el movimiento de los endosomas (Wallar, B.J. *et al.*, 2007).

3.3 Papel de las forminas durante la activación de los linfocitos T

Existen en general pocos trabajos sobre la función de las forminas en los linfocitos T. Los estudios iniciales indicaron que la formina mDia1, que es una molécula efectora de RhoA, es regulada durante la activación del linfocito T y se localiza en el frente de avance de los linfocitos T durante la migración. La expresión de una forma activada de esta formina produce a un aumento en la formación de filamentos de actina. Esto tiene como consecuencia un bloqueo de la polimerización de actina inducida por quimioquinas al disminuir el nivel de G-actina disponible y un impedimento en el movimiento celular (Vicente-Manzanares, M. *et al.*, 2003). Los linfocitos T de ratones mDia1^{-/-} presentan defectos en su tráfico a los órganos linfoides, contienen pocos filamentos de actina, y no se polarizan en respuesta a un estímulo quimiotáctico (Sakata, D. *et al.*, 2007). Asimismo, el despliegue (“spreading”) de las células T mDia1^{-/-} en soportes recubiertos con anticuerpos anti-CD3 y CD28 es también defectuoso (Eisenmann, K.M. *et al.*, 2007), y la actina se polariza en menor cantidad en la zona del TCR contactado.

Los linfocitos T expresan una gran variedad de forminas, entre las que se encuentran Dia1-3, y FMNL1-3. Un análisis de la distribución subcelular de Dia1 y FMNL1 reveló que ambas forminas se polarizan a la SI en los conjugados con células APC y que en células en estado estacionario se distribuyen en la región pericentrosomal, microtúbulos y membrana plasmática principalmente. Utilizando shARN dirigido contra cada una de estas dos forminas, se observó que su silenciamiento no afectaba a la polarización de la actina en la SI, proceso que depende del complejo Arp2/3 (Gomez, T.S. *et al.*, 2007). Sin embargo, tanto FMNL1 como Dia1 resultaron necesarias para que la reorientación del centrosoma a la SI se produjera de forma eficiente. Puesto que Dia1 se une a RhoA y a Cdc42 mientras que FMNL1 lo hace a RhoA y Rac1, se utilizaron técnicas de silenciamiento con shARN para examinar si Rac1 y Cdc42 controlaban la reorientación del centrosoma, comprobándose que solo el silenciamiento de Rac1 producía una reducción importante (Gomez, T.S. *et al.*, 2007) (Fig. 1.11). Este resultado contrasta con resultados previos obtenidos utilizando dominantes negativos de Cdc42 que implicaban a Cdc42 en este proceso (Stowers, L. *et al.*, 1995)

También se ha puesto de manifiesto la importancia de la Dia1 en la citotoxicidad mediada por células NK. El silenciamiento de Dia1 no afecta a la reorganización de la actina en la sinapsis lítica, pero sí genera defectos en el citoesqueleto de tubulina como la localización de los microtúbulos en la sinapsis lítica (Butler, B. y Cooper, J.A., 2009). Curiosamente, la falta de Dia1 no afecta a la relocalización del centrosoma en la sinapsis lítica en estas células.

3.4 La formina INF2

La proteína INF2 fue inicialmente incluida junto con INF1 en el subgrupo de las forminas

invertidas (INF), cuya característica estructural es poseer los dominios FH en el extremo amino terminal, ya que solo se disponían de cADNs en los que el inicio de su fase de lectura abierta correspondía al comienzo del dominio FH2. Sin embargo, estudios posteriores de nuestro laboratorio y de otro laboratorio pusieron de manifiesto que esos cADNs eran solo parciales y que el cADN completo de INF2 codifica por una proteína más grande con dominios FH1 y DID como en otras forminas. Un análisis comparativo con el resto de las forminas sitúa a INF2 más cercana a las forminas Dia1-3 que a otras forminas (Madrid, R. et al., 2010).

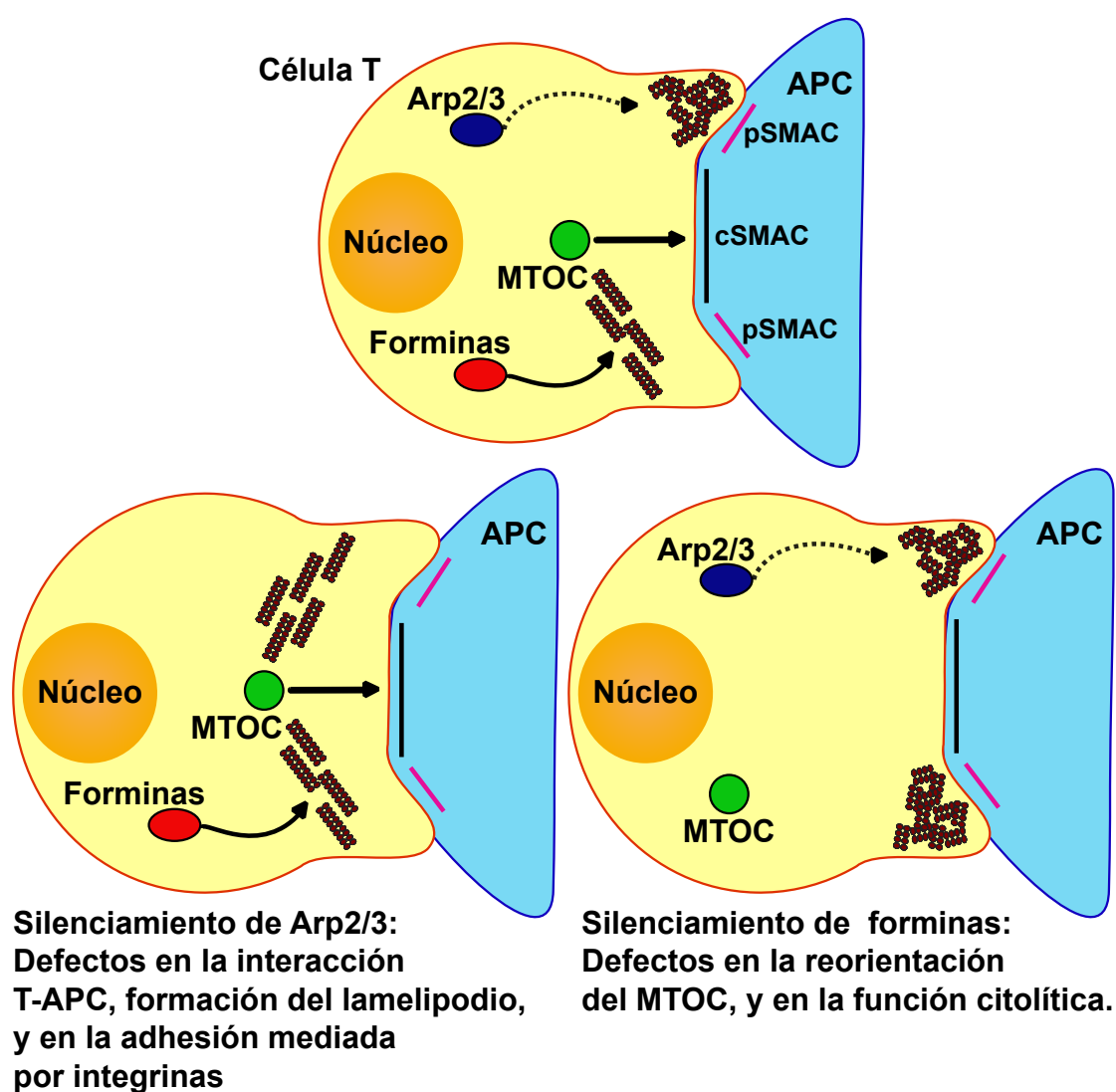


Figura 1.11. Las forminas y el complejo Arp 2/3 actúan en procesos distintos en linfocitos T. El complejo Arp2/3 es necesario para la polarización de actina en el lamelipodio de la zona de contacto. Las forminas Dia1 y FMNL1, son necesarias para la reorientación del centrosoma (MTOC) inducida por la activación de TCR en la SI. Imagen modificada de (Schwartzberg, P.L., 2007).

Por lo tanto, INF2 está compuesta por los dominios característicos de las Drfs, aunque no posee un dominio GBD entero como el de éstas. Existen al menos dos isoformas de INF2, INF2-1 e INF2-2, que difieren en su extremo carboxilo terminal. El extremo carboxilo de INF2-1 tiene la

secuencia CIVQ que se asemeja a las señales consenso CAAX de prenilación, donde A representa cualquier amino ácido y X a un aminoácido hidrofóbico (Fig. 1.12). De hecho, en el caso de la INF2-1 murina se ha demostrado que su carboxilo terminal se encuentra farnesilado (Chhabra, E.S. *et al.*, 2009)

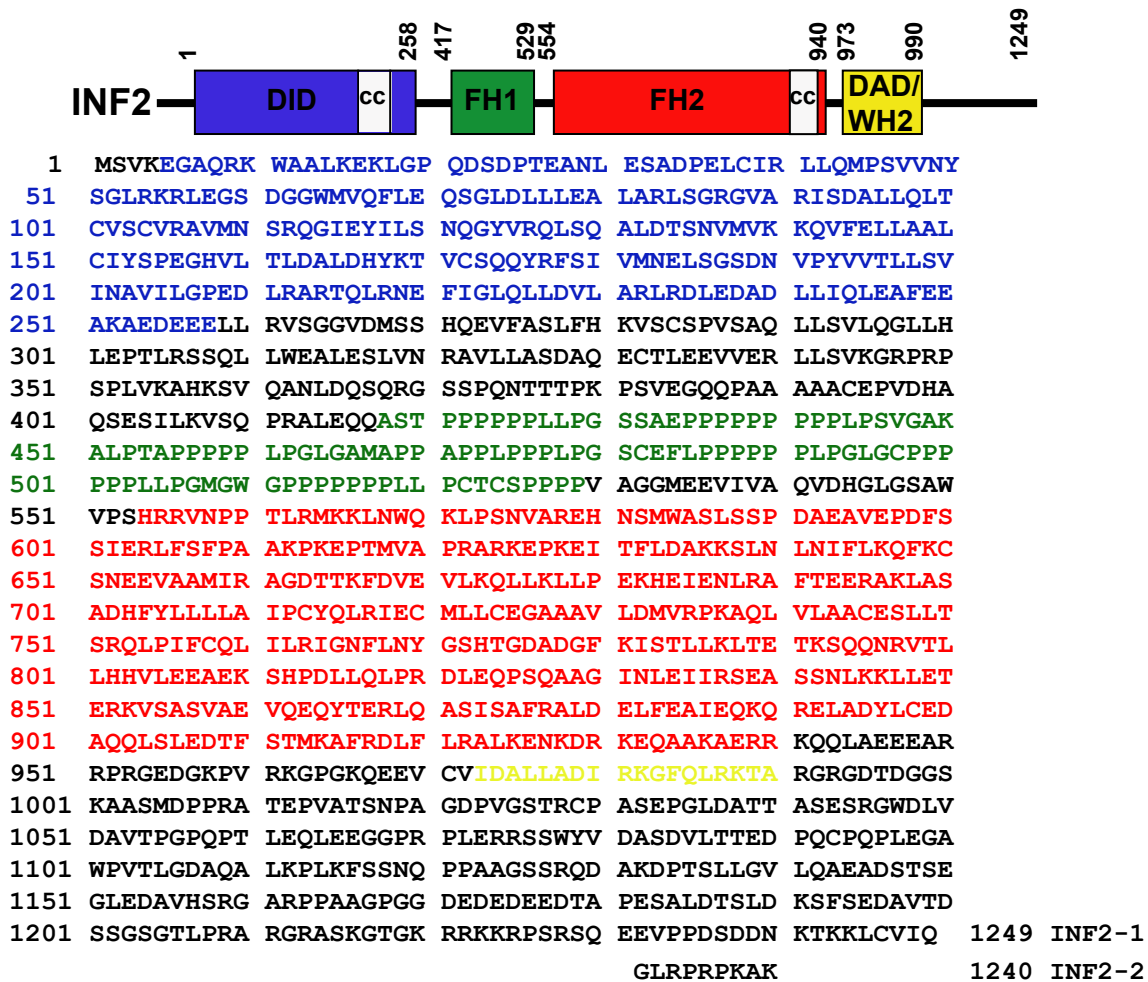


Figura 1.12. La formina INF2. Esquema de la organización de la proteína INF2 y estructura primaria de la proteína INF2 humana. Existen dos isoformas, INF2-1 e INF2-2, que difieren en su extremo carboxilo terminal.

Una característica única particular de INF2 es que, a diferencia de las otras forminas analizadas que solo son capaces de nuclear la polimerización de actina, INF2 también es capaz de despolimerizar actina *in vitro* (Chhabra, E.S. y Higgs, H.N., 2006). El DAD de INF2, que como en otras forminas se encuentra a continuación del extremo carboxilo del dominio FH2, tiene similitud con dominios WASP homology 2 (WH2), que son dominios capaces de unir G-actina. Este secuestro de actina no explica los efectos de la despolimerización por sí solo, sino que la proteína también precisa de una actividad que trocee los filamentos de actina. Esta actividad todavía no ha sido mapeada con exactitud pero se sabe que se requiere que la región FH1-FH2-DAD-Cterm de INF2 esté íntegra. Los estudios *in vitro* con fragmentos de INF2 han puesto de manifiesto que la interacción de los dominios DID/DAD no inhibe la actividad nucleadora de actina, lo que le

hace diferir de las Drf, pero sí bloquea su actividad despolimerizadora. Se desconocía si INF2 une alguna GTPasa de la familia Rho que pudiera regular su activación como es el caso de las Drfs.

Otro tipo de estudios definieron a INF2 como una proteína asociada a la cara citoplásmica del retículo endoplásmico en células Swiss 3T3 (Chhabra, E.S. *et al.*, 2009). La farnesilación de INF2 es necesaria pero no suficiente para su localización en el retículo endoplásmico. Trabajos muy recientes han puesto a INF2 en un contexto patológico (Lee, H.K. *et al.*, 2010). Así, mutaciones dentro del DID de INF2 en pacientes humanos correlacionan con padecimiento de glomeruloesclerosis segmental focal (FSGS), uno de los tipos de síndrome nefrótico más frecuentes en niños y adolescentes (Brown, E.J. *et al.*, 2009).

3.5 MAL2 interacciona con la formina INF2 y regula el transporte de proteínas desde la membrana basolateral a la apical

Los hepatocitos son células epiteliales de hígado especializadas cuya superficie apical delimita un lumen en forma de canales estrechos, el canalículo biliar, que es usado para el drenaje biliar. El dominio apical/luminal en los hepatocitos está situado en la cara lateral y delimita el canalículo biliar. La ruta principal de transporte de proteínas a la superficie apical/luminal tiene lugar por un proceso denominado transcitosis que consiste en la endocitosis de proteínas en la membrana basolateral y su posterior transporte a través de la célula en vesículas con destino a la superficie apical (Rodríguez-Boulán, E. *et al.*, 2005; Mellman, I. y Nelson, W.J., 2008). MAL2, miembro de la familia MAL de proteínas, fue identificado como un componente esencial de esta ruta de transporte en la línea de hepatoma humana HepG2 (de Marco, M.C. *et al.*, 2002; de Marco, M.C. *et al.*, 2006).

Mediante el rastreo de una genoteca por el método del doble híbrido en levadura utilizando la proteína MAL2 como cebo, se identificó como positiva la interacción con un fragmento del extremo carboxilo terminal de INF2 (Fanayan, S. *et al.*, 2009; Madrid, R. *et al.*, 2010). La interacción fue corroborada posteriormente por ensayo de co-inmunoprecipitación y arrastre (“pull-down”). El estudio funcional de esta interacción indicó que INF2 colabora con MAL2, promoviendo mediante la polimerización de filamentos cortos de actina (“cometas”), el movimiento de vesículas de MAL2 desde la superficie subapical, que es donde reside mayoritariamente, a las cercanías de la superficie basolateral. Una vez allí, las vesículas MAL2⁺ captarían el material endocitado desde la superficie basolateral y lo conducirían por transcitosis a la superficie apical. Mediante el empleo de mutantes de INF2 con su capacidad polimerizadora o despolimerizadora de actina alteradas, se observó que ambas actividades de INF2 son necesarias para que tenga lugar el proceso. Esta observación concuerda con que tanto la actividad polimerizadora como la despolimerizadora son necesarias para la formación *in vitro* de filamentos cortos de actina. Además, se determinó que la RhoGTPasas Cdc42, en mayor medida, y Rac 1, pero no RhoA, eran capaces de unirse *in vitro* al DID de INF2, aunque solamente Cdc42 parece jugar un papel en la regulación de INF2 durante la transcitosis. En resumen, INF2 regularía el tráfico de vesículas MAL2⁺ desde la superficie basolateral a la apical

en un proceso dependiente de la formación de cometas de actina por parte de INF2 y que estaría regulado por Cdc42 (Fig. 1.13).

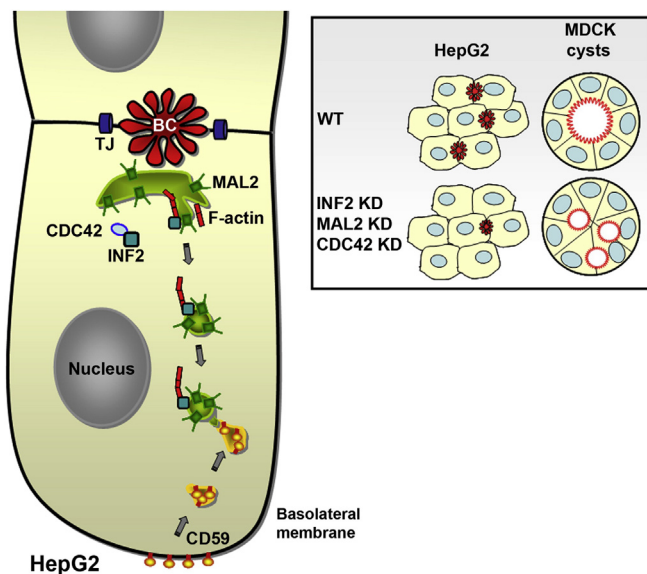


Figura 1.13. La forma INF2 se une a MAL2, un componente de la maquinaria de transcitosis. INF2 media en la asociación de las vesículas MAL2+ con los cometas de actina. El silenciamiento de INF2 impide la distribución normal de MAL2 y la transcitosis apical. La unión de INF2 con Cdc42 es necesaria para la transcitosis apical y la formación del lumen. Imagen tomada de (Madrid, R. et al., 2010).

4. MICROTÚBULOS ESTABLES

4.1 Microtúbulos estables frente a dinámicos

Los microtúbulos son uno de los componentes del citoesqueleto. Están implicados en el mantenimiento de la polaridad y la forma celular, y en el movimiento de vesículas, orgánulos, cromosomas, etc. Los microtúbulos son polímeros formados por heterodímeros de α y β -tubulina. Los dímeros se unen formando protofilamentos, y 13 de estos se unen lateralmente formando tubulos cilíndricos. Cuando la tubulina polimeriza, la subunidad α se une a una β de otro dímero para formar el protofilamento. Esto hace que el microtúbulo esté polarizado con un extremo con una subunidad α , llamado (-), y otro con una subunidad β , llamado (+). El extremo (-) está protegido por proteínas que impiden su elongación, por lo que la polimerización ocurre en el extremo (+), de crecimiento rápido. La polimerización de los microtúbulos ocurre en el centrosoma, que es el principal centro organizador de microtúbulos (MTOC), aunque existen otros MTOC secundarios que pueden llevar a cabo el ensamblaje de microtúbulos. En el centrosoma existe una tubulina especial, la tubulina γ , que se combina con otras proteínas y sirve de plataforma al extremo (-) para que los dímeros α/β comiencen la polimerización (Fig.1.15 B).

Los microtúbulos sufren modificaciones post-traduccionales que son clave para modular sus funciones celulares. La modificación mejor estudiada es la detirosinación, que consiste en la eliminación del residuo de tirosina, Tyr, presente en el extremo carboxilo-terminal de la α -tubulina en los llamados Tyr-microtúbulos (Tyr-MT). Este proceso genera los llamados Glu-microtúbulos (Glu-MT) porque deja expuesto en el extremo carboxilo terminal un resto de glutámico, Glu, que es el aminoácido que sigue a la Tyr en la secuencia de la molécula intacta de α -tubulina. El proceso

es reversible y la Tyr puede ser añadida al extremo amino terminal de los Glu-MT generando de nuevo Tyr-MT (Fig. 1.14). La tinción con anticuerpos específicos para Glu y Tyr-tubulina demostró que las células contienen las dos poblaciones de microtúbulos. En células en interfase la mayor parte de los microtúbulos son Tyr-MT, una pequeña cantidad son Glu-MTs, y solamente algunos microtúbulos contienen ambos tipos (Bulinski, J.C. y Gundersen, G.G., 1991) (Fig. 1.15).

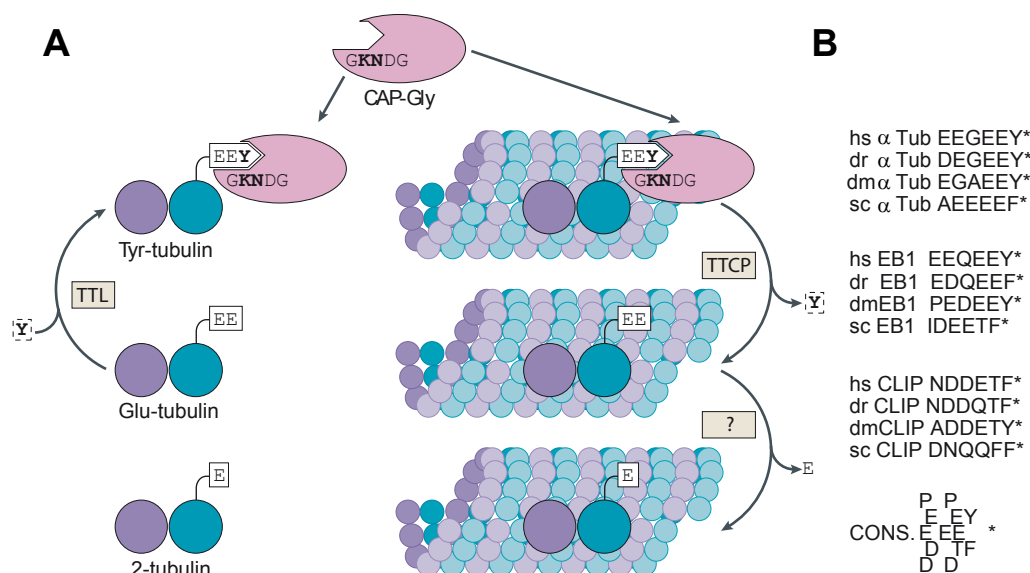


Figura 1.14. Ciclo de tirosinación-detirosinación de la tubulina. (A) Durante este ciclo el residuo Tyr carboxilo terminal se elimina de la secuencia de la tubulina por la Tyr carboxipeptidasa (TTCP), y se volvería a añadir por la Tyr ligasa (TTL). Al eliminar la Tyr se expone un residuo Glu en la tubulina. El residuo Glu puede eliminarse, por un proceso desconocido y generar un producto que no es sustrato de la TTL. (B) Secuencias consenso en el carboxilo terminal de la tubulina (Tub), EB1 o CLIP en distintas especies. Imagen tomada de Akhmanova, A. y Steinmetz, M.O., 2008

En la mayor parte de las células sin diferenciar, la red microtubular está dispuesta de una forma radial compuesta de microtúbulos muy dinámicos (vida media de 5-10 min). Durante la migración celular, los microtúbulos que irradian hacia el frente de avance son mucho más estables (vida media >1 h). Estos microtúbulos están enriquecidos en tubulina acetilada, Acet-MT, en el grupo amino ϵ de la Lys40 de la α -tubulina y acumulan Glu-MT, diferenciándose así de los microtúbulos dinámicos que son del tipo Tyr-MT (Bartolini, F. y Gundersen, G.G., 2009). Al menos en fibroblastos, la formación de los microtúbulos estables es independiente de la reorientación del centrosoma (Palazzo, A.F. *et al.*, 2001b). Los Glu-MT son más resistentes que los Tyr-MT a la despolimerización por nocodazol, un compuesto despolimerizador de microtúbulos, o por temperaturas bajas. Es importante destacar que la detirosinación es un resultado, y no la causa, de la estabilidad de los microtúbulos. Aunque la detirosinación y la acetilación son las modificaciones más estudiadas, la tubulina también puede sufrir otras modificaciones, tales como la fosforilación, poliglutaminación o poliglicinación.

4.2 Microtúbulos estables en células epiteliales polarizadas

La polaridad celular consiste, por un lado, en la distribución asimétrica de moléculas reguladoras entre diferentes partes de la célula, y por otro lado, en la organización de los componentes del citoesqueleto (actina y microtúbulos principalmente) a lo largo del eje de polaridad. La polarización de los microtúbulos en células en migración se produce por el posicionamiento del centrosoma en uno de los polos, entre el núcleo y la dirección de migración, y por la estabilización de una población de microtúbulos en el frente de avance. Ambos procesos ocurren por rutas independientes aunque coordinadas. Así, la reorientación del centrosoma entre el frente de avance y el núcleo de fibroblastos 3T3 en migración se produce gracias a un proceso mediado por Cdc42, en el que interviene también el complejo dineína-dinactina, mientras que la estabilización de microtúbulos está mediada por RhoA y mDia1 (Palazzo, A.F. *et al.*, 2001b; Gomes, E.R. *et al.*, 2005). En realidad, en las células 3T3 no es el centrosoma el que se reorienta sino que Cdc42, Par6/PKC ζ y el complejo dineína-dinactina mantiene el centrosoma en el centroide, o centro de la célula, mientras que el núcleo se mueve a la parte opuesta al frente de avance en un proceso regulado también por Cdc42 y en el que están implicados la quinasa MRCK, la miosina II y el flujo de actina (Gomes, E.R. *et al.*, 2005).

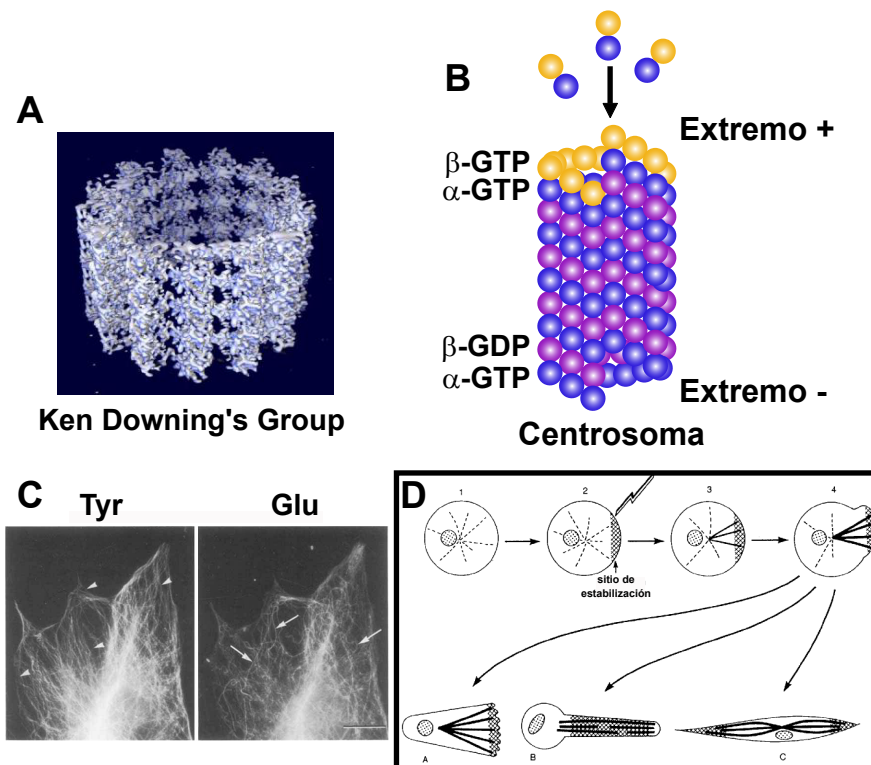


Figura 1.15. Microtúbulos estables. (A) Reconstrucción tridimensional de microtúbulos intactos usando criomicroscopía electrónica y procesamiento de imágenes (Tomado de <http://vis.lbl.gov/Vignettes/KDowning-Microtubules/index.html>). (B) Esquema de un microtúbulo creciente. (C) Inmunodetección doble para Tyr y Glu-MT, en células TC-7. Los microtúbulos detectados sólo con uno de los dos anticuerpos están indicados con flechas. Figura tomada de (Gundersen, G.G. *et al.*, 1984). (D) Microtúbulos estables en la morfogénesis celular. Modelo: célula esférica que sólo posee microtúbulos dinámicos, 1/ una señal externa genera un sitio de estabilización, 2/ se estabilizan microtúbulos en la zona, 3/ que posteriormente se modifican, 4/ dependiendo de la señal de estabilización la célula se polarizará de distintas maneras gracias a los microtúbulos estables.

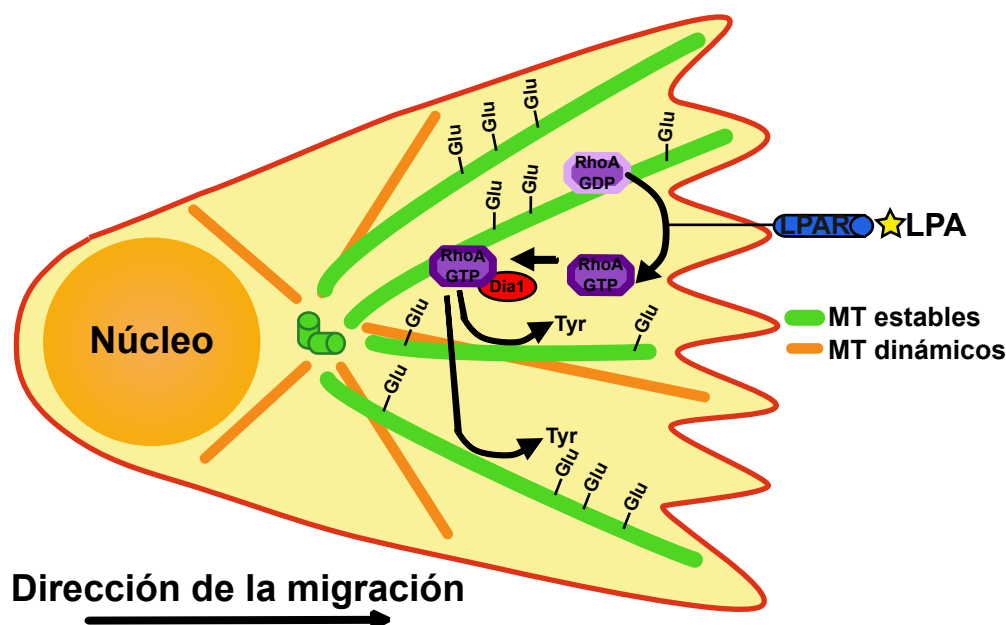


Figura 1.16. Esquema de los microtúbulos estables en fibroblastos en migración. LPA, ácido lisofosfatídico. LPAR, receptor de LPA.

-Los microtúbulos estables y las forminas

Al menos cuatro forminas de mamífero (mDia1, mDia2, Formin1-1b e INF1) interaccionan directamente con microtúbulos. En el caso de mDia1-2 se ha visto que tienen un papel fundamental en la generación de los microtúbulos estables. El sitio de unión a microtúbulos para mDia1-2 está en el dominio FH2, que es un dominio muy conservado en las forminas. En el caso de INF1, la interacción ocurre por su zona carboxilo terminal, que es única para esta proteína (Young, K.G. *et al.*, 2008).

En monocapas de fibroblastos en migración, los Glu-MT se forman específicamente en el frente de avance, y están orientados en la dirección de la migración (Fig. 1.16). Se ha descrito al ácido lisofosfatídico, presente en el suero, como el factor activador de la estabilización de microtúbulos. La GTPasa RhoA, que se activa por la ruta de señalización del receptor de ácido lisofosfatídico, se encontró que era necesaria para la inducción de Glu-MT. Posteriormente, se identificó a mDia1 como el efector de RhoA que mediaba la estabilización de los microtúbulos (Palazzo, A.F. *et al.*, 2001a).

La región de mDia1 responsable de la estabilización de microtúbulos es su dominio FH2, por lo que tanto la actividad de esta formina sobre la estabilidad de los microtúbulos como su actividad de nucleación y polimerización de actina residen en este mismo dominio. Sin embargo, estas dos actividades no son interdependientes ya que ciertas mutaciones puntuales en la región FH2 de mDia2 que bloquean su actividad polimerizadora de actina, no impiden su actividad estabilizadora de microtúbulos (Bartolini, F. *et al.*, 2008).

mDia1-2 tienen actividad estabilizadora de microtúbulos pero actúan junto con otras

proteínas. mDia1 se une directamente a EB1 y adenomatous poliposis coli, dos +TIPS (plus end tracking proteins), proteínas que se unen al extremo + de microtúbulos, y lo hace regulando estos factores. EB1 se une con la proteína adenomatous poliposis coli, y es posible que formen un complejo junto con mDia2 (Wen, Y. *et al.*, 2004). mDia también es capaz de regular la actividad de las quinasas que contribuyen a estabilizar microtúbulos. GSK3 β es un regulador negativo de la estabilidad, y su fosforilación mediada por mDia1 requiere de PKC atípicas (Eng, C.H. *et al.*, 2006). Recientemente se ha descrito que INF1 es necesaria para la formación de Acet-MT ya que al silenciar INF1 se reducen los niveles de este tipo de microtúbulos sin afectar, curiosamente, a los Glu-MT (Young, K.G. *et al.*, 2008).

4.3 Microtúbulos estables en linfocitos

Se ha observado que la cantidad de Acet-MT aumenta ligeramente tras la formación de conjugados T-APC en presencia de SEE. Estos microtúbulos se sitúan entre el centrosoma y la zona de contacto. La enzima deacetilasa 6 (HDAC6), que tiene actividad deacetilasa sobre la tubulina, regula el nivel de acetilación de los microtúbulos, así como la translocación del centrosoma a la zona de contacto (Serrador, J.M. *et al.*, 2004).

La forma mDia1 no parece necesaria para la polarización del centrosoma delante del núcleo durante la sinapsis lítica de las células NK pero, sin embargo, sí lo es para que la detirosinación y acetilación de los microtúbulos tenga lugar con normalidad (Butler, B. y Cooper, J.A., 2009). Esto implicaría que, al menos en este tipo de células, la reorientación del centrosoma y la estabilización de microtúbulos son procesos independientes, aunque no descarta la participación de los microtúbulos estables en el proceso de reorientación del centrosoma.

Durante la migración los linfocitos T presentan Acet-MT concentrados en el urópodo. El tratamiento con la droga nocodazol elimina los microtúbulos estables. La ruta de señalización RhoA/ROCK sería un regulador negativo de la estabilización de tanto Acet-MT como Glu-MT durante la migración. La estimulación del TCR activaría la ruta de estabilización gracias a la inhibición de ROCK (Takesono, A. *et al.*, 2010).

En fibroblastos, Rac1 estabiliza microtúbulos vía PAK1, ya que fosforila e inactiva Op18, un fuerte desestabilizador de microtúbulos. La activación de células T con anti-CD3 o la expresión de formas activadas de Rac1, llevan a un aumento en la estabilización de microtúbulos, por una mayor fosforilación de Op18. Este aumento en la estabilidad de los microtúbulos podría estar implicada en la disminución en la motilidad de los linfocitos observada tras la activación del TCR (Cernuda-Morollon, E. *et al.*, 2010).

2.-OBJETIVOS

OBJETIVOS DEL TRABAJO DE INVESTIGACIÓN

1. Estudio de la implicación de la nueva proteína formina INF2 en el transporte, mediado por MAL, de Lck a membrana plasmática en linfocitos T.
2. Análisis de la función de INF2 en la reorientación del centrosoma y la estabilización de microtúbulos durante la formación de la sinapsis inmunológica en linfocitos T.

3.-MATERIALES Y MÉTODOS

1. MATERIALES

1.1 Líneas celulares y células primarias

- **Jurkat** (línea celular linfoblastoide T humana)
- **Raji** (línea celular linfoblastoide B humana)
- **PBLs** (linfocitos T de sangre periférica)

1.2 Anticuerpos

El hibridoma productor de anticuerpos monoclonales de ratón 6D9 (anti-**MAL** humano), utilizado en ensayos de inmunotransferencia, fue generado en nuestro laboratorio (Millan, J. y Alonso, M.A., 1998).

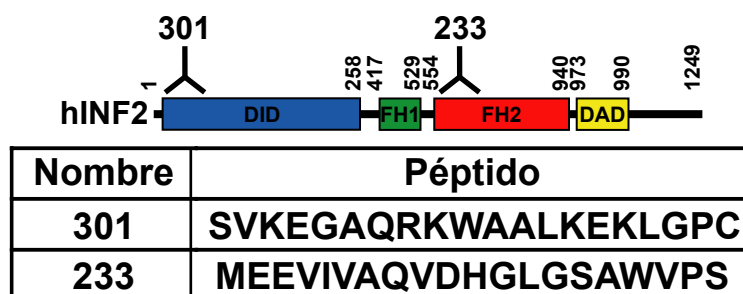


Figura 3.1. Esquema de los anticuerpos generados contra INF2. Esquema que muestra la región contra la que van dirigidos los anticuerpos anti-INF2, 233 y 301, y el péptido específico que reconocen en la proteína.

Los anticuerpos policlonales de conejo 301 y 233 contra la proteína formina **INF2** se generaron en nuestro laboratorio (Madrid, R. *et al.*, 2010).

Para detectar la quinasa **Lck** se emplearon distintos anticuerpos: un anticuerpo monoclonal de ratón (IgG2a) de BD Transduction Laboratories y otro policlonal de conejo donado por el Dr. A. Veillette (McGill University, Montreal, Canadá). El mAb de ratón anti-**ICAM-3** clon HP2/19.1.1 (IgG2a) fue cedido generosamente por el Dr. F. Sánchez-Madrid (Hospital Universitario de la Princesa, Madrid, España).

Para el trabajo con microtúbulos se usaron distintos anticuerpos específicos para las distintas tubulinas; **tubulina α** , monoclonal de ratón, clon DM1A (IgG1), Sigma-Aldrich; **tubulina γ** , monoclonal de ratón clon GTU-88 (IgG1), Sigma-Aldrich; **tubulina α acetilada**, monoclonal de ratón clon 6-11B-11 (IgG2b), Sigma-Aldrich; **Tyr-tubulina**, monoclonal de rata clon YL1/2 (IgG2a), Santa Cruz; tubulina detirosinada o **Glu-tubulina**, policlonal de conejo, cedido amablemente por el Dr. G.G. Gundersen, Columbia University, NY, USA.

El hibridoma productor del anticuerpos monoclonal de ratón OKT3 (anti **CD3 ϵ** , IgG2a) utilizados para los ensayos de inmunofluorescencia fue adquirido a la American Type Culture Collection (ATCC) (Manassas, VA). Para la detección del epítipo **c-myc** se usaron dos anticuerpos: el mAb de ratón 9E10 (IgG1) adquirido a Roche y un anticuerpo policlonal de conejo procedente de Santa Cruz. El mAb de ratón anti-**GAPDH** clon 6C5 (IgG1) se compró a Millipore. El mAb

de rata anti-**CD4 murino** clon GK 1.5., se obtuvo de Santa Cruz. Los mAb de ratón usados para detectar las RhoGTPasas, **RhoA**, **Rac** y **Cdc42** procedieron de BD Transduction Laboratories.

Los anticuerpos secundarios anti-IgG de ratón o conejo acoplados a peroxidasa (HPR) empleados en inmunotransferencia fueron adquiridos a Jackson (West Grove, PA).

Los anticuerpos secundarios anti-IgG de ratón, conejo o rata acoplados a fluoróforos Alexa fueron adquiridos a Molecular Probes (Invitrogen).

Para la detección por inmunotransferencia con el sistema infrarrojo Odyssey se usan los anticuerpos de mono anti-IgG de conejo IRDye-680 y anti-IgG de ratón IRDye-800, ambos de LI-COR.

Para la detección de actina filamentosa (F-actina) se utilizó faloidina acoplada a Alexa 488, Alexa 647 o TRITC, todas ellas procedentes de Invitrogen.

1.3 Reactivos

La solución comercial separadora de linfocitos (densidad 1,077 g/ml) que se empleó para aislar los PBLs procedió de Cora (Comercial Rafer, Zaragoza, España).

El compuesto fluorescente CMTMR (Orange-fluorescent tetramethylrhodamine) para el marcaje de las células Raji en conjugados se adquirió a Invitrogen.

El superantígeno SEE (Staphylococcal enterotoxin E) necesario para la presentación y reconocimiento de antígeno en los experimentos de conjugación T-APC fue suministrado por Toxin Technology (Sarasota, FL).

La poli(L)lisina y la fibronectina utilizadas para adherir los linfocitos al sustrato, la γ -globulina empleada para bloquear los receptores Fc de las células Raji, la formalina utilizada para fijar las células y la geneticina (G418) empleada como antibióticos de selección de clones establemente transfectados son productos de Sigma-Aldrich.

El medio de montaje Fluoromont G se compró a Southern Biotechnology Associates Inc. (Birmingham, AL).

Las membranas de Immobilon-P utilizada para ensayos de inmunotransferencia son productos de Millipore (Bedford, MA).

Los marcadores de peso molecular preteñidos así como la solución de acrilamida-bisacrilamida utilizados para la electroforesis en geles de poliacrilamida fueron proporcionados por Bio-Rad Laboratories, Inc.

Las drogas actina citocalasina D, latrunculina A, jasplakinolide así como el nocodazole y el taxol son de Calbiochem (EMD4Biosciences).

1.4 Plásmidos y oligonucleótidos

A lo largo de este trabajo se han generado construcciones de distintos fragmentos de la proteína INF2 tanto acoplados a la proteína fluorescente GFP como al epítipo c-myc o a GST (Madrid, R. *et al.*, 2010). Las construcciones usadas para la expresión de las proteínas INF2 contienen sólo las secuencias codificantes del ADNc de INF2, siendo sus productos de expresión resistentes a la

depleción por el shINF2b (ver más adelante). Las secuencias de todas las construcciones fueron verificadas por secuenciación automática. En el plásmido pGEX-4T1 (Amerhan Biosciences) se han clonado los siguientes fragmentos de INF2 (DID, FH2DAD, Cterm-1, Cterm-2) fusionados con GST (Glutathione S-transferase) para su uso en experimentos de “pull-down”.

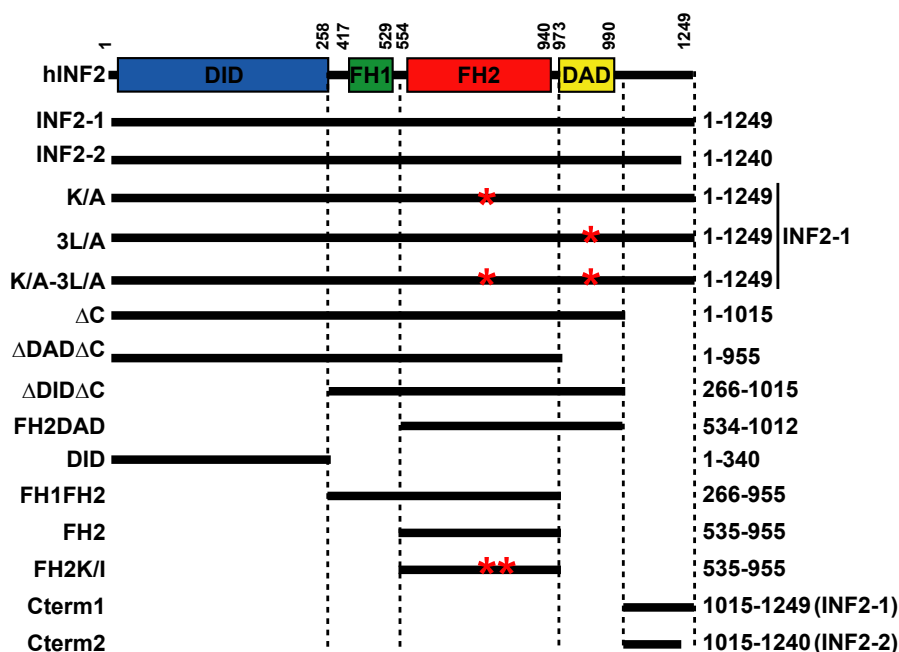


Figura 3.2. Esquema de las construcciones de INF2. Esquema que muestra los fragmentos de la proteína INF2 acoplados al apítopo c-myc, GFP o GST expresados en este estudio.

La construcción de MAL utilizada es la Cherry/MAL que contiene la región codificante del ADNc de la proteína MAL clonada fase con la región codificante de la proteína cherry en el plásmido mCherry C1 de Clontech (Takara Bio Company).

La construcción de Lck utilizada es la Cherry/Lck: ADNc de la molécula Lck clonada en fase con la proteína cherry en el plásmido mCherry N1 de Clontech (Takara Bio Company).

p75-GFP (Kreitzer, G. *et al.*, 2000) fue cedida por el Dr. E. Rodriguez-Boulan (Cornell University, Ithaca, NY).

La construcción CD4/Lck, que expresa el ectodominio y la región transmembrana del CD4 murino fusionada en su parte citoplásmica a la Lck murina, fue descrita previamente (Xu, H. y Littman, D.R., 1993). La región que codifica por la quimera CD4/Lck fue subclonada posteriormente en el plásmido pCR3.1 (Anton, O. *et al.*, 2008).

pEGFP-tubulin (α -tubulina) fue cedido por la Dra. I. Correas (Centro de Biología Molecular Severo Ochoa).

GFP-actin fue generado en nuestro laboratorio a partir del YFP-actin de Clontech.

La construcción EB3-GFP fue amablemente cedida por la Dra. E. Cernuda (Hospital universitario central de Asturias, Oviedo España).

Las construcciones Rac1V12, Rac1N17, Cdc42V12 y Cdc42N17-myc fueron cedidas

por los Drs. J. Millán y F. Martín-Belmonte (Centro de Biología Molecular Severo Ochoa).

Para la generación de las construcciones que expresan shARN (short hairpin ARN) específicos se diseñaron oligonucleótidos sintéticos que contenían las secuencias indicadas en la **Tabla I** separadas por de su secuencia complementaria por el espaciador 5'-TTCAAGAGA-3'. Estos oligonucleótidos se clonaron en el vector pSuper.retro.neo+GFP (OligoEngine) bajo el control del promotor H1 (Brummelkamp, T.R. *et al.*, 2002), específico de la ARN polimerasa III. Este vector expresa además de forma independiente la proteína GFP permitiendo así la detección de las células deplecionadas por su fluorescencia verde. En el caso de la secuencia shINF2a, se expresó también en un vector similar que expresaba de forma independiente la proteína Cherry, generándose así el plásmido pSupershINF2a/Cherry. Esta construcción es de gran utilidad para la identificación de las células que expresaban shINF2a en el caso de experimentos de co-expresión con proteínas GFP (Figura 3.3).

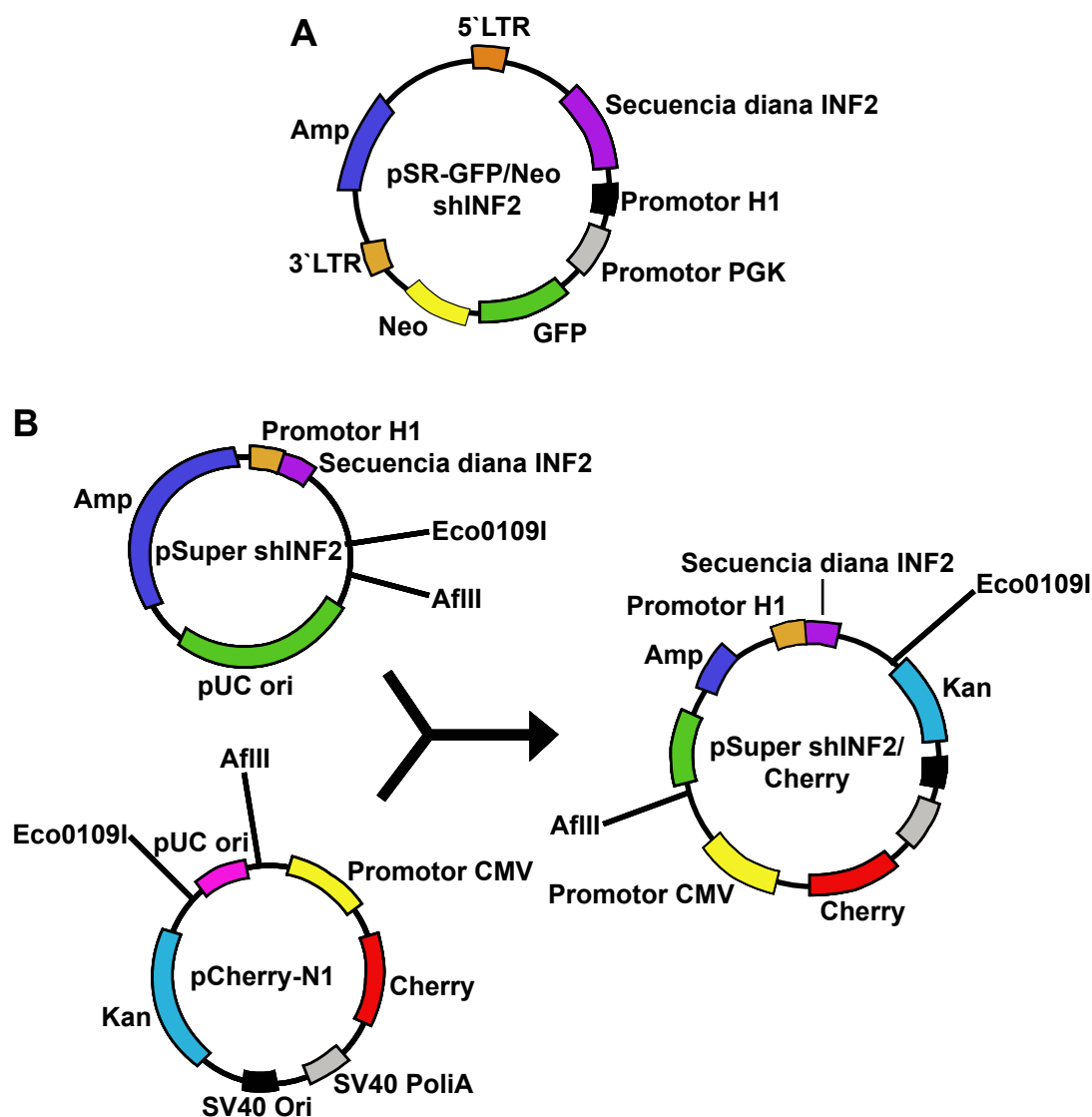


Figura 3.3. Esquema de los plásmidos pSuper shINF2. (A) Esquema de los plásmidos pSuper.retro.neo-GFP shINF2 a y y del b. (B) Esquema que muestra los pasos seguidos para la construcción del plásmido recombinante pSuper shINF2a/Cherry a partir del pSuper.basic shINF2a y del pmCherry-N1.

La construcción pSuper shMAL/GFP, que co-expresa de forma independiente GFP yshRNA específico de MAL fue generado anteriormente en el laboratorio (Anton, O. *et al.*, 2008).

Las construcciones realizadas en el vector pGeneCLIP hMGFP que fueron utilizadas para expresar shARN para silenciar la expresión de las proteínas RhoA, Rac1, Cdc42, hDia1 y FMNL1 procedieron de SABiosciences (Qiagen). La estrategia utilizada consistió también en la expresión de shARN y de la proteína GFP a partir del mismo plásmido. Para realizar experimentos de co-expresión con proteínas GFP, en el caso del plásmido con la secuencia shCdc42 se sustituyó el ADNc de la proteína GFP por el de la proteína Cherry.

Tabla I. Secuencias diana utilizadas para la construcción de plásmidos que expresan shARN.

shCONTROL	AAGCGTCCAGGCCAACCTA
shINF2a	GTACCGCTTCAGCATTGTC
shINF2b	CTTGGCCATCACATCAACA
shMAL	TCATGGCCCCCGCAGCGGC
shRhoA	ACCTGAAGAAGGCAGAGATAT
shRac1	TCCGCAAACAGATGTGTTCTT
shCdc42	GTGGAGTGTTCTGCACTTACA
shhDia1	GGAACGTGATGTTCAGAATTT
shFMNL1	AGGAAGACGCGACTCAGAATT

2. MÉTODOS

2.1 Cultivos celulares

Las células fueron crecidas en medio RPMI 1640 suplementado con 10% de suero de ternera fetal (Sigma-Aldrich), 10 mM glutamina, 50 U/ml penicilina y 50 µg/ml estreptomicina, a 37°C en una atmósfera con 5% CO₂, 95% aire.

2.2 Experimentos de conjugación

Las células B Raji, que fueron utilizadas como células presentadoras de antígeno, fueron previamente incubadas durante 30 minutos a 37°C con SEE a una concentración final de 4 µg/ml en medio de cultivo completo. Luego fueron añadidas sobre las células T en proporción 1:1 por 15 minutos a 37°C. Los conjugados se adhirieron sobre cubreobjetos pretratados con poli(L)lisina.

Para ciertos experimentos las células Raji fueron marcadas con sonda CMTMR roja en medio sin suero antes de ser cargadas con el SEE.

2.3 Transfección

Las células T, Jurkat, se resuspendieron en RPMI completo al 20% de suero a una concentración de 10×10^6 células/ml. 500 μ l de esta suspensión se mezclaron con 45 μ g del ADN plasmídico correspondiente. La transfección se realizó mediante electroporación en un aparato Gene Pulser II (Bio-Rad) en condiciones de 264 V y 975 μ F utilizando una cubeta de 0,45 μ m (Bio-Rad).

2.4 Análisis de microscopía de fluorescencia

Las células sobre cubreobjetos pretratados con poli(L)lisina son fijadas con formalina a temperatura ambiente durante 15 minutos, lavadas y tratadas 10 minutos con 10 mM de glicina en PBS pH 7,4 en PBS para bloquear los grupos aldehído libres. En algunos casos, se permeabilizaron después con 0,2% Triton X-100 a 4°C o con metanol a -20°C durante 5 minutos. El bloqueo se realizó en 3% de albúmina bovina en PBS. En el caso de los conjugados de células T con APC, se añadió γ -globulina durante 30 minutos a temperatura ambiente. Las células fueron incubadas con los anticuerpos primarios apropiados 1 hora en cámara húmeda a temperatura ambiente, lavadas varias veces e incubadas 30 minutos con la combinación apropiada de anticuerpos secundarios acoplados a fluoróforos Alexa. La actina fue detectada con faloidina fluorescente. Los cubreobjetos se montaron sobre los portaobjetos usando el medio de montaje Fluoromount G.

Las preparaciones fueron analizadas mediante sistema de microscopía confocal, usando los equipos: LSM510 Meta (Zeiss) y LSM510 Invertido (Zeiss). Las imágenes adquiridas fueron procesadas con los programas LSM5 Image Browser (Zeiss), Image J, Adobe Photoshop CS2 y montadas en Adobe Illustrator 10. Algunas imágenes fueron cuidadosamente deconvolucionadas con el programa Huygens 3.0 (S.V.I.).

2.5 Videomicroscopía

Estos experimentos se realizaron en placas de cultivo especiales que poseen un cubreobjetos de vidrio en el fondo. Se pretrataron con fibronectina a 20 μ g/ml durante toda la noche a 4°C. Tras varios lavados fueron bloqueadas con HBSS (140 mM NaCl, 4,7 mM KCl, 1 mM MgCl_2 , 1,5 mM CaCl_2 , 10 mM glucosa, 10 mM Hepes, pH 7,4) al 1% de suero durante 30 minutos a 37°C. Para este tipo de experimentos se transfectaron transitoriamente las células T y se dejó expresar la proteína de fusión fusionada a GFP o Cherry durante 24h.

Las células T se resuspendieron en medio HBSS al 3% de suero y 20 mM Hepes a una concentración de 5×10^5 células/ml. 300 μ l de esta suspensión de células fueron añadidos sobre la placa especial ya bloqueada que se incubó durante 30 minutos a 37°C para facilitar la adhesión de los linfocitos T al cubreobjetos de la placa.

Para experimentos de videomicroscopía de conjugados de células T con las células presentadoras, las células Raji se marcaron con una sonda fluorescente para poder distinguirlas de las células T. Para ello, se resuspendieron a una concentración de 3×10^6 células/ml en RPMI sin suero, y se incubaron 30 minutos a 37°C en presencia de la sonda CMTMR (excitación a 541

nm, emisión a 565 nm) a 5 μ M. Para eliminar la sonda que no había penetrado en las células se lavó con RPMI al 10% de suero. Finalmente se resuspendieron las células Raji ya marcadas en el mismo medio que las células T (HBSS con 3% de suero y 20 mM Hepes, pH 7,4) y se añadieron sobre éstas.

Las series de imágenes fueron tomadas en un microscopio confocal LSM Meta, manteniendo temperatura, humedad y CO₂ constantes (37°C y 5% de CO₂). Las imágenes fueron tomadas a intervalos de 11 s para la videomicroscopía simultánea de MAL-Cherry y GFP-Tubulina, cada 1,6 s en el caso de MAL-Cherry y EB3-GFP o cada 6 s en el caso del seguimiento individual de MAL-Cherry o Lck-Cherry.

Analizadas posteriormente con los programas MetaMorph (Universal Imaging) e ImageJ (NIH, USA) fueron cuidadosamente deconvolucionados con el programa Huygens 3.0. (S.V.I.).

2.6 Electroforesis e inmunotransferencia

Las muestras fueron mezcladas con tampón Laemmli 2X (125 mM Tris-HCl, pH 6,8, 4% SDS, 25% glycerol, 0,01% bromophenol blue, 10% β -mercaptoetanol) y hervidas durante 10 minutos a 95°C para desnaturalizar las proteínas.

La electroforesis se llevó a cabo en geles de poliacrilamida (Bio-Rad) en presencia de 10% SDS. El porcentaje de acrilamida utilizado en cada caso fue el adecuado para resolver correctamente la proteína de interés según su peso molecular. Posteriormente las proteínas resueltas en la electroforesis se transfirieron a membranas de Immobilon-P. El bloqueo de la membrana se hace con 5% de leche desnatada en PBS y 0,2% Tween-20. La incubación de la membrana con el anticuerpo adecuado se llevó a cabo durante 1 hora a temperatura ambiente. Después de varios lavados se incubó la membrana durante 1 hora con el anticuerpo secundario acoplado a peroxidasa y se reveló por quimioluminiscencia utilizando un kit comercial (GE Healthcare), o con anticuerpos acoplados a fluoróforos infrarrojos para ser detectados en el aparato Oddisey (LiCor).

2.7 Aislamiento de membranas resistentes a detergente (DRMs)

Para el aislamiento de DRMs se utilizó la centrifugación de equilibrio en gradientes discontinuos de densidad de sacarosa (Millan, J. *et al.*, 2003). Para ello partimos de 3×10^7 células Jurkat crecidas a una concentración aproximada de 5×10^5 células/ml. Tras varios lavados con PBS se lisaron durante 30 minutos a 4 °C en el tampón de lisis TNE (25 mM Tris-HCl, pH 7,4, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA) 0,2% Tritón X-100 suplementado con inhibidores de fosfatasa (25 μ M NaF, 1 mM ortovanadato sódico, 1 mM ácido okadaico, 10 mM β -glicerofosfato) e inhibidores de proteasas (100 μ g/ml PMSF, 1 μ g/ml leupeptina, 1 μ g/ml aprotinina y 1 μ g/ml pepstatina A). La lisis se realizó empleando una relación de 10 μ l de tampón de lisis / 1×10^6 células. Se homogenizó el lisado pasándolo 5 veces por una aguja de tamaño 22-G y se mezcla con solución de sacarosa al 70% en relación 1:1 quedando a una concentración aproximada del 35%. Este extracto se sitúa en el fondo de un tubo transparente de ultracentífuga Beckman de 4 ml de capacidad. Sobre él

se sitúan 3 ml de una solución de sacarosa al 30% y 1 ml de otra solución de sacarosa al 5%, con especial cuidado de mantener intactas las interfases entre las capas de sacarosa de distinta densidad. La muestra se sometió a ultracentrifugación de equilibrio 20 horas a 4°C y 53.000 rpm en un rotor flotante Beckman TST60.4. Se recogen 0,5 ml de la fracción insoluble (interfase entre las capas de sacarosa del 5% y del 30%) donde “flotan” los DRMs y 0,5 ml de la fracción soluble (fondo del tubo). A la fracción insoluble se le añadió N-octil-glucósido a una concentración final de 60 mM para solubilizar los DRMs. Las muestras se analizaron mediante electroforesis e inmunotransferencia.

2.8 Aislamiento y transfección de linfocitos T de sangre periférica (PBLs)

Se tomó una muestra de sangre de un donante sano, la cual se depositó en un tubo sobre un colchón de solución separadora de linfocitos (Cora, Comercial Rafer) con cuidado de mantener intacta la interfase entre ambos fluidos. Se centrifuga durante 40 minutos a temperatura ambiente a 700 xg. Se recogieron las células presentes en la interfase (linfocitos y monocitos), que quedan así separadas de los glóbulos rojos depositados en el fondo del tubo (capaces de atravesar el colchón de solución separadora). Las células recogidas se lavaron dos veces con PBS y se sembraron en placas de cultivo 2 horas con RPMI completo al 10% de suero para que se peguen los monocitos y poder desecharlos. Se recogió el sobrenadante donde están concentrados los linfocitos.

La transfección de los PBLs se hizo mediante electroporación (Nucleofector, Amaxa) siguiendo las recomendaciones de la casa comercial para transfectar linfocitos primarios (1x10⁷ células en 500 µl de solución Human T-Cells, 10 µg de ADN y programa U14). Se dejó que los PBLs expresaran el ADN transfectado durante 48 horas y, posteriormente, fueron sometidos a fijación para inmunofluorescencia.

2.9 Análisis de interacciones directas por el sistema de doble-híbrido de levadura

Los cultivos de levadura *Saccharomyces cerevisiae* Hf7c se crecieron a 30°C en medio líquido o sólido basado en el medio enriquecido YPD (2% bactopectone, 1% extracto levadura, 2% dextrosa), o medio mínimo SD (0.67% yeast nitrogen base sin aminoácidos, 2% dextrosa, con los suplementos aminoácidos adecuados) para la expresión de la librería del cribado y el ensayo de interacción directa. Para el cribado de la librería de expresión de ADNc, se cotransfectaron en células Hf7c las construcciones pAS21-MAL/MAL2 como cebo y la librería de carcinoma de mama en pAS-GAL4. La interacción directa fue medida por la determinación cualitativa de la actividad del gen reportero HIS3 (Fanayan, S. *et al.*, 2009; Madrid, R. *et al.*, 2010).

2.10 Ensayos de “pull-down”

Para los ensayos de “pull-down” INF2-MAL, la fracción DRMs de células Jurkat fueron solubilizadas con 60 mM de octil-glucósido, y se incubaron con 10 µg de proteína GST

o construcciones GST-INF2 inmovilizadas en bolas de GSH-Sepharose (GE Healthcare Life Sciences) durante 1 hora a 4°C en el medio de lisis (50 mM Tris-HCl pH 7,4, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 0,2% Tritón X-100) y una mezcla de inhibidores de fosfatasas y proteasas). Las bolas se lavaron 3 veces en medio de lisis y las proteínas unidas se detectaron por inmunotransferencia con el anticuerpo 6D9 contra MAL.

Para los ensayos de “pull-down” de las RhoGTPasas las células Jurkat se lisaron en TBS, 0,1% SDS, 1% Tritón X-100, 0,5 mM DTT, 0,5 M EDTA, pH 8.0 y una mezcla de inhibidores de proteasas. Se precargaron las RhoGTPasas endógenas incubando los lisados celulares en presencia o ausencia de 50 μ M del análogo no hidrolizable del GTP GMP-PNP (Roche) durante 10 minutos a 30°C. La reacción se paró añadiendo 10 mM de $MgCl_2$. Para el ensayo de unión 10 μ g de proteína GST se incubaron 35 minutos a 4°C en buffer de lisis que contenía 10 mM $MgCl_2$ con los lisados precargados con GMP-PNP. Las bolas se lavaron 3 veces en medio de lisis y las proteínas unidas se detectaron por inmunotransferencia.

2.11 Unión a microtúbulos

-Sedimentación de microtúbulos

Partimos de un lisado de células Jurkat resuspendidas en buffer A 1/10 (MES 1 M, 5 mM $MgCl_2$, 20 mM EGTA) a 4°C durante 10 minutos para hacer una rotura hipotónica suave. Se hacen una serie de centrifugaciones seriadas: 1000 xg a 4°C para eliminar núcleos, 100.000 xg a 4°C durante 1 hora para eliminar las membranas, y al sobrenadante añadirle taxol y GTP e incubar a 37°C durante 35 minutos para favorecer la polimerización de microtúbulos manteniendo su estabilidad. Se centrifugan a 50.000 xg en una centrífuga TLA-100 durante 35 minutos a 37°C sobre un colchón de sacarosa al 15%. En el pellet final caen los microtúbulos junto con las proteínas celulares que se unen a ellos.

-Unión a microtúbulos estabilizados con taxol

Usar 2 μ M de la proteína a estudiar unida a GST junto con 12,5 μ M de tubulina. Generar microtúbulos a partir de tubulina en un volumen de 50 μ l en una reacción con buffer PEM (80 mM PIPES, 1 mM $MgCl_2$, 1 mM EGTA, pH 6,9), 1mM GTP y taxol de manera seriada hasta 10 μ M durante 1 hora a 37°C. Preaclara las proteínas a 100.000 xg durante 10 minutos a 30°C para eliminar agregados. Mezclar las proteínas GST con los microtúbulos 30 minutos a temperatura ambiente en buffer PEM suplementado con 100 mM de GTP. Centrifugar a 100.000 xg 10 minutos a 30°C. En el pellet aparecen los microtúbulos y las proteínas que se unen a ellos.

2.12 Estabilización de microtúbulos

Tanto las proteínas-GST purificadas y dializadas en buffer PEM (80 mM PIPES, 1 mM $MgCl_2$, 1 mM EGTA, pH 6,9) como la tubulina son preaclaraadas a 100.000 xg 10 minutos a 4°C para eliminar agregados. Incubar 2 μ M de la proteína unida a GST a estudiar con 12 μ M de

tubulina. En un volumen final de 25 μ l mezclar en buffer PEM suplementado con 100 mM GTP, la tubulina y la proteína-GST junto con nucleadores de taxol para favorecer la polimerización. Favorecer la polimerización de microtúbulos a 35°C durante 1 hora. Poner la reacción en hielo 30 minutos. Separar sobrenadante del pellet a 100.000 xg durante 10 minutos. En el pellet habrá microtúbulos si han sido protegidos de la despolimerización inducida por frío por efecto de la proteína a estudiar.

4.-RESULTADOS

1. La formina INF2 interacciona con MAL

Con el fin de encontrar proteínas que interaccionen con la proteína MAL se llevó a cabo un estudio de interacción por doble híbrido en levadura utilizando uno de los cADN aislados previamente en un rastreo de una genoteca de carcinoma mamario en el que se usó MAL2 como cebo. Este cADN, denominado 255C1 o Cterm1, correspondía a los 255 aminoácidos de la zona carboxilo terminal de la formina INF2-1 humana (Chhabra, E.S. y Higgs, H.N., 2006). Tanto MAL2 como MAL interaccionaron con el fragmento de INF2-1 mientras que las proteínas D52/D53/D54, utilizadas como control, interaccionaron exclusivamente con MAL2 (Figura 4.1 A). Este resultado fue confirmado mediante experimentos de “pull-down” utilizando el mismo fragmento de INF2-1 fusionado a GST o el fragmento equivalente de INF2-2 (Cterm2). Como control se observó que el fragmento FH2DAD que carece del dominio carboxilo terminal no era capaz de unirse a MAL (Fig. 4.1B y C). Así, al igual que MAL2 (Madrid, R. *et al.*, 2010), MAL también se une a INF2 y esta asociación se produce por la región carboxilo terminal de INF2.

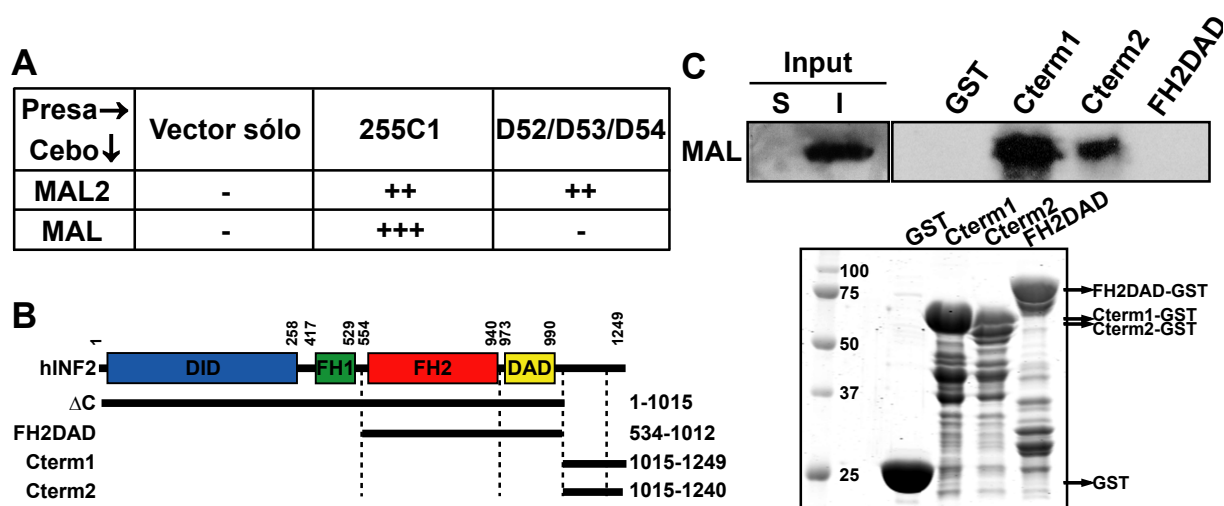


Figura 4.1. Caracterización de INF2 como proteína que interacciona con MAL. (A) La línea celular de levaduras HF7C fue cotransfectada con pAD-GAL4 255C1 o las proteínas D52-like (presa) y las construcciones que codifican las proteínas enteras MAL o MAL2 (cebo). El crecimiento de las levaduras en medio sólido a 30°C se determinó como sigue: -, no crecimiento tras 6-8 días; ++, crecimiento tras 3-4 días; +++, crecimiento tras 1-2 días. (B) Esquema de las construcciones de INF2 usadas en los experimentos de las Figuras 4.1, 4.2 y 4.3. (C) Experimento de “pull-down” con fragmentos de INF2 acoplados a GST de las fracciones insolubles en detergente de células Jurkat. La presencia de MAL endógeno se detectó por inmunotransferencia con el mAb 6D9 (panel superior). La tinción con azul de coomassie muestra las proteínas GST utilizadas en el ensayo (panel inferior).

En células Jurkat en estado estacionario, INF2 se localizó en la periferia de la célula, la región pericentriolar y los microtúbulos (Fig. 4.2 A). De forma coherente con los experimentos que mostraban su asociación, se encontró un nivel alto de colocación entre la proteína endógena INF2 y MAL en células Jurkat. La expresión exógena de INF2-1 e INF2-2 reprodujo casi con exactitud la distribución de la proteína endógena (Fig. 4.2 B). El fragmento Cterm1 expresado exógenamente se distribuyó en la periferia celular, la región pericentriolar y los microtúbulos, de la misma manera que la proteína INF2-1 entera. Por el contrario, una proteína INF2-1 sin esta región (ΔC), se localizó exclusivamente en la periferia celular (Fig. 4.2 C).

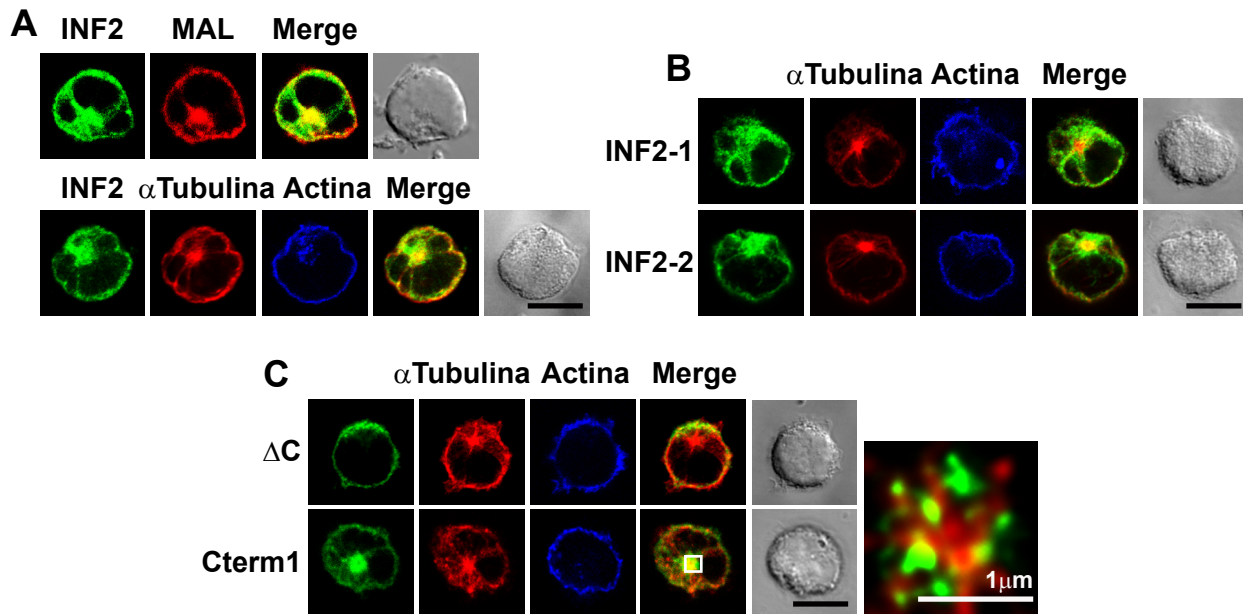


Figura 4.2. Distribución subcelular de INF2 en células Jurkat. (A) Las células Jurkat transfectadas transitoriamente (panel superior) o no (panel inferior) con MAL-Cherry se tiñeron para INF2 (panel superior), o para INF2, α -tubulina y F-actina (panel inferior). (B) Las células Jurkat que expresaban de manera transitoria INF2-1 e INF2-2 acopladas a GFP, fueron fijadas y teñidas para α -tubulina y F-actina. (C) Células Jurkat que expresaban de manera transitoria los fragmentos indicados de INF2-1, acoplados a GFP, fueron fijadas y teñidas para α -tubulina y actina. Se muestra un plano x-y representativo en cada caso. Se incluye también una ampliación de una imagen deconvolucionada de la región pericentriolar de las células transfectadas con Cterm1 para mostrar que este fragmento se localiza alrededor del centrosoma. Se muestra una imagen de Nomarski del campo de la célula en cada caso. Las barras de tamaño corresponden a 5 μ m si no se indica otro valor.

2. INF2 es necesaria para la formación de vesículas de transporte que contienen MAL

Para estudiar el posible papel que cumple INF2 en la distribución y función de MAL en linfocitos T, se usó una estrategia de pérdida de función mediante la transfección de las construcciones pSuper-shINF2a y b que expresan shARN específico para INF2 y GFP a partir del mismo plásmido pero utilizando diferentes promotores, permitiendo así la identificación de las células transfectadas. Tras seleccionar y separar la población transfectada en un citómetro, se observó por inmunotransferencia que tanto la expresión de shINF2a como de shINF2b eran capaces de reducir los niveles endógenos de INF2 en las células Jurkat con respecto a un shARN control (Fig. 4.3 A). Se comprobó también que los niveles de MAL o Lck no se veían afectados por el silenciamiento de INF2 (Fig. 4.3 B).

La distribución de la proteína MAL en células Jurkat que expresan el plásmido shControl no se veía afectada con respecto a las de las células sin transfectar en estado estacionario encontrándose la proteína MAL en la periferia celular y la región pericentriolar y en vesículas que se distribuyen a lo largo de los microtúbulos radiales (Anton, O. *et al.*, 2008). La disminución de los niveles de INF2 con cualquiera de los dos shARN utilizados redujo considerablemente la presencia de MAL en la periferia celular e indujo una acumulación muy notable de MAL en el interior celular (Fig. 4.4).

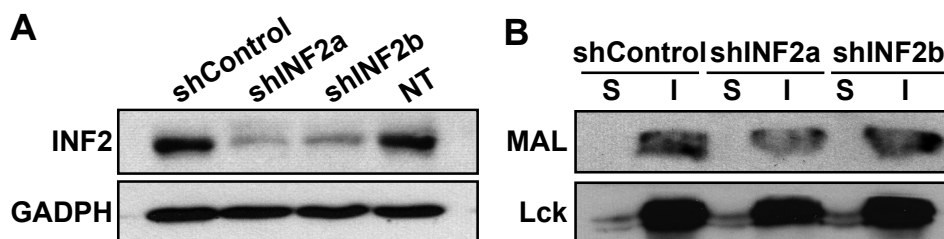


Figura 4.3. La expresión de shARN específicos disminuye los niveles de INF2 en células Jurkat. (A) Células Jurkat transfectadas o no (NT) con construcciones de ADN que coexpresaban GFP y shControl, shINF2a o shINF2b fueron procesadas para inmunotransferencia con los anticuerpos anti-INF2 y anti-GAPDH, utilizado como control de carga de proteína total. (B) Células Jurkat transfectadas con shControl, shINF2a o shINF2b fueron sometidas a centrifugación de equilibrio para separar la fracción de membranas insolubles en detergente. La presencia de MAL y de Lck fue detectada con anticuerpos específicos.

Para estudiar si INF2 está implicado en la formación de vesículas que contienen MAL se comparó la dinámica de células Jurkat con niveles normales o silenciados de INF2 (Fig. 4.5).

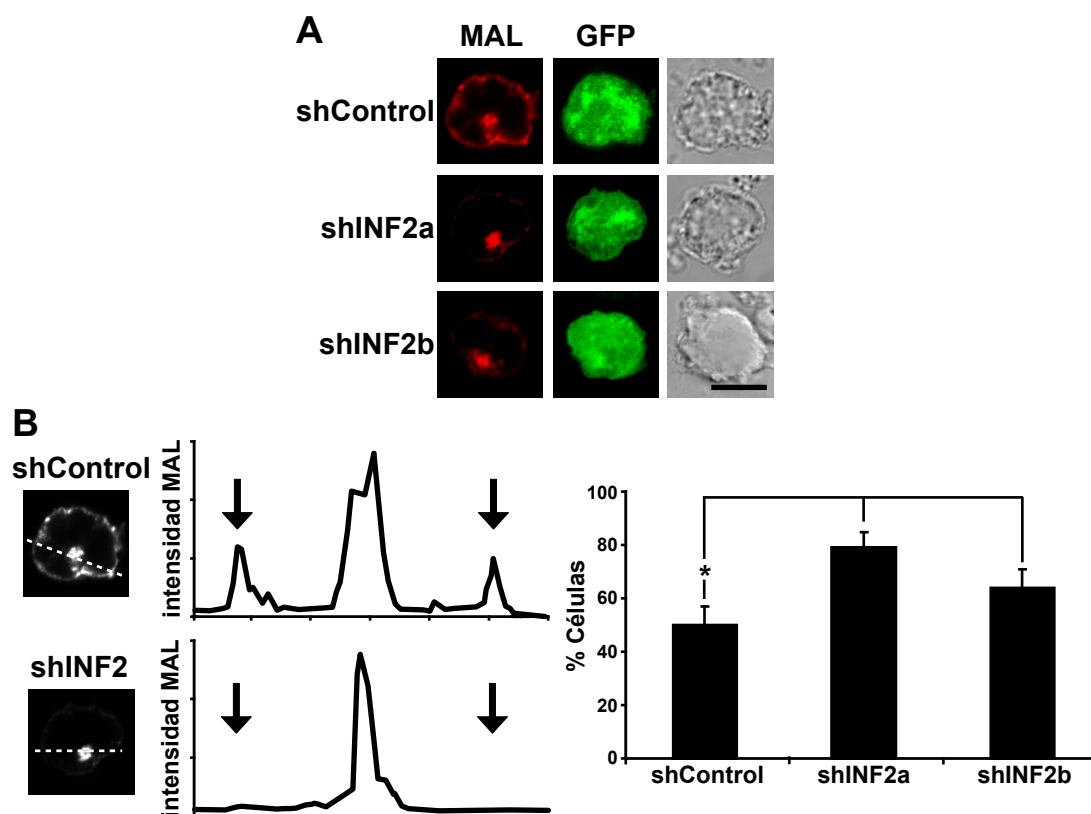


Figura 4.4. El silenciamiento de INF2 disminuye la expresión de MAL en la membrana plasmática. (A) Células Jurkat silenciadas para INF2 con dos shARN distintos, a y b, fueron cotransfectadas con MAL-Cherry y se procesaron para analizar la distribución de MAL. (B) La intensidad de la tinción de MAL se determinó por análisis densitométrico a lo largo de una línea, como se muestra en un experimento representativo. Las flechas indican la posición de la periferia celular. El histograma muestra el porcentaje medio \pm SEM de células con niveles bajos de MAL en la membrana plasmática. La intensidad de la marca fue analizada en al menos 50 células por experimento. Se llevaron a cabo tres experimentos independientes (*, $p < 0,05$).

Para visualizar el transporte de MAL hacia la membrana plasmática se transfectó transitoriamente la construcción MAL-Cherry junto con los distintos shARN. Los experimentos de videomicroscopía permitieron observar que mientras que en las células control las vesículas positivas para MAL se formaban en la región pericentriolar y alcanzaban la membrana plasmática, la salida de estas vesículas estaba bloqueada en células Jurkat silenciadas para INF2.

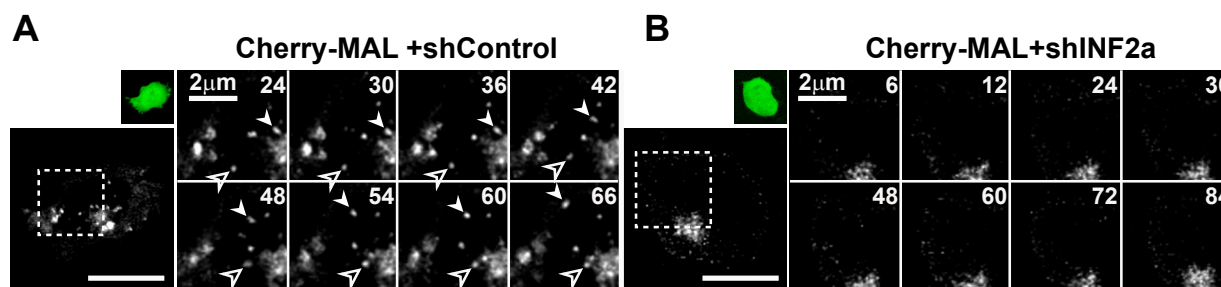


Figura 4.5. El silenciamiento de INF2 bloquea la salida de vesículas MAL⁺ desde la región perinuclear. Células Jurkat que expresaban transitoriamente MAL-Cherry se transfectaron con los plásmidos shControl-GFP (A) o shINF2a-GFP (B) y fueron analizadas por videomicroscopía. Las células transfectadas se identificaron por la expresión de GFP. Los procesos que ocurren en zona encuadrada se muestran a mayor aumento en los paneles de la derecha. Las flechas sólidas y huecas indican vesículas que transportan MAL desde la región pericentriolar a la membrana plasmática o haciendo el camino opuesto, respectivamente. Los números indican el tiempo en segundos. La barra de tamaño indica 5 μm si no se especifica otro valor.

Por lo tanto, la expresión de INF2 es necesaria para la formación de vesículas MAL⁺ en la región pericentriolar y su llegada a la membrana plasmática de las células Jurkat.

3. INF2 es necesaria para el transporte de Lck a la membrana plasmática

Nuestro laboratorio describió anteriormente la importancia de MAL en el transporte de Lck hacia la membrana plasmática en los linfocitos T (Anton, O. *et al.*, 2008). Como INF2 es necesario para la dinámica de MAL, decidimos investigar si también INF2 es requerida para el transporte vesicular de Lck a la membrana plasmática. Se silenció la expresión de INF2 mediante la expresión de shINF2a o shINF2b y se observó que, en ausencia de INF2, Lck no era capaz de llegar hasta la membrana plasmática, como ocurre en la situación control, y se producía una acumulación de Lck en el interior celular (Fig. 4.6) de manera similar a lo que ocurre en células con la expresión de MAL silenciada (Anton, O. *et al.*, 2008). La distribución del complejo TCR/CD3, usado como control, no se vio afectado por la reducción de los niveles de INF2.

Para visualizar el transporte de Lck hacia la membrana plasmática se transfectó transitoriamente la construcción Lck-Cherry junto con los distintos shARN. Los experimentos de videomicroscopía permitieron observar que mientras que en las células control las vesículas exocíticas que transportan Lck hacia la membrana plasmática se forman con normalidad, la formación de estas vesículas resultó estar bloqueada en las células Jurkat deficientes en INF2 (Fig. 4.7 A). El transporte a membrana plasmática de la proteína p75, usada como control, tuvo lugar de manera independiente de los niveles de INF2 (Fig. 4.7 B).

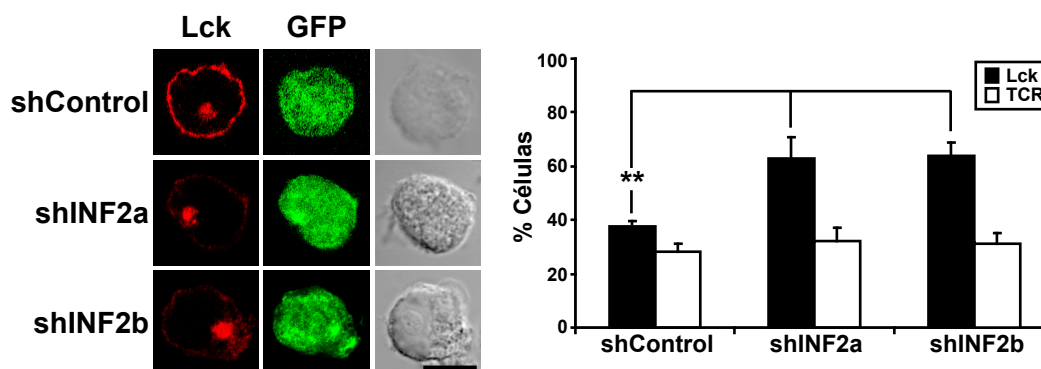


Figura 4.6. El silenciamiento de INF2 disminuye la expresión de Lck en la membrana plasmática. Células Jurkat silenciadas para INF2 con dos shARN distintos, a y b, se procesaron para analizar la distribución de Lck endógena. El histograma muestra el porcentaje medio \pm SEM de células con niveles bajos de Lck en la periferia. La distribución del TCR se usó como control. La intensidad de la marca fluorescente fue medida en al menos 50 células por experimento. Se llevaron a cabo tres experimentos independientes (**, $p < 0,01$). La barra de tamaño indica 5 μ m.

Teniendo en cuenta que el dominio carboxilo terminal es el responsable de la unión de INF2 con MAL y que, por lo tanto, podría interferir con la interacción entre ambas proteínas, se transfectó transitoriamente la construcción Cterm1-GFP y se analizó la distribución de Lck. El porcentaje de células con un nivel bajo de proteína Lck en membrana plasmática aumentó de forma considerable en las células transfectadas (Fig. 4.8A). Este experimento nos indica que Cterm1 parece actuar como un dominante negativo de INF2 impidiendo el transporte de Lck a la membrana plasmática. Como control se observó que la expresión exógena de la proteína INF2-1 completa mimetizó la función de la proteína endógena y permitió la llegada de Lck a la membrana

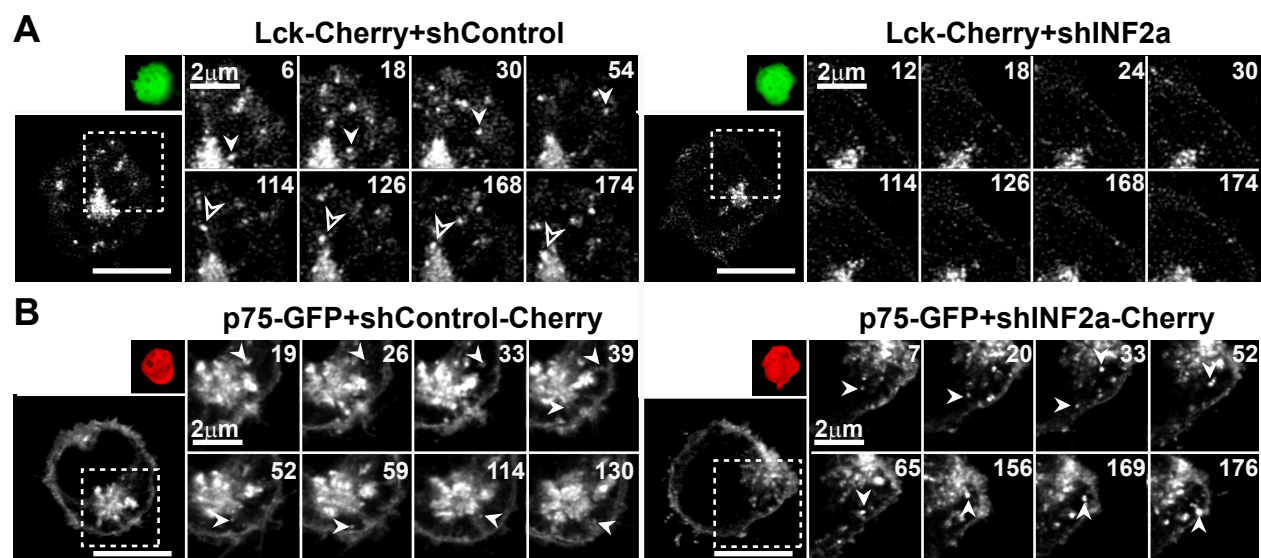


Figura 4.7. El silenciamiento de INF2 bloquea la formación de vesículas de transporte exocítico que contienen Lck. (A) Células Jurkat que expresaban transitoriamente shControl-GFP o shINF2a-GFP junto con Lck-Cherry se analizaron por videomicroscopía. Las células transfectadas se identificaron por la expresión de GFP. Los procesos que ocurren en la parte recuadrada se muestran a mayor aumento en los paneles de la derecha. Las flechas sólidas o huecas indican vesículas que transportan MAL desde la región pericentriolar a la membrana plasmática o haciendo el camino opuesto, respectivamente. (B) El transporte de p75-GFP fue utilizado como control de tráfico vesicular que no era afectado por los niveles de expresión de INF2. Los números indican el tiempo en segundos. La barra de tamaño indica 5 μ m si no se especifica otro valor.

plasmática. Sin embargo, como la sobreexpresión de Cterm1 no produjo ningún cambio detectable en la distribución subcelular de la proteína INF2 endógena (Fig. 4.8 B), seguramente sólo una pequeña población de INF2 colabora con el transporte de Lck mediado por MAL.

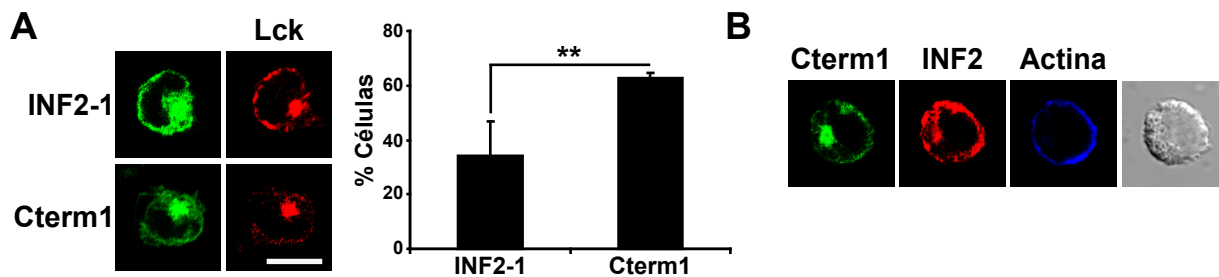


Figura 4.8. La expresión de Cterm1 disminuye los niveles de Lck en la membrana plasmática. (A) Células Jurkat que expresaban las proteínas INF2-1 o Cterm1 fusionadas a GFP se tiñeron para Lck endógena. El histograma muestra el porcentaje medio \pm SEM de células con niveles bajos de Lck en la periferia celular. Se llevaron a cabo tres experimentos independientes (**, $p < 0,01$). (B) Las células que expresaban Cterm1-GFP se tiñeron para INF2 y F-actina. La barra de tamaño indica 5 μ m.

En resumen, estos experimentos indican que la expresión de INF2 es necesaria para la formación de las vesículas que transportan Lck hacia la membrana plasmática de las células Jurkat.

4. Las vesículas MAL[±] se mueven a lo largo de los microtúbulos

Parte de la proteína MAL en células Jurkat en estado estacionario se detecta sobre el haz de microtúbulos orientados radialmente que parte de la región centrosomal (Fig. 4.2). Quisimos por lo tanto investigar el posible papel del citoesqueleto de tubulina en el tráfico de MAL y de Lck. Para ello se cotransfectaron las células Jurkat con construcciones que expresaban MAL (Fig. 4.9 A) o Lck (Fig. 4.9 B) fusionadas a la proteína fluorescente Cherry, junto con GFP-tubulina, y se examinaron al microscopio confocal *in vivo*, para preservar intacta la distribución de las proteínas. Se encontró que MAL se distribuía en vesículas individuales a lo largo de los microtúbulos. Las vesículas que transportan Lck, al ser las mismas que las de MAL, se encontraron también a lo largo de los microtúbulos. Cuando se analizaron por videomicroscopía las células cotransfectadas con MAL-Cherry y GFP-tubulina se observó que las vesículas MAL⁺ surgían continuamente desde el compartimento interno con dirección a la periferia celular y que este movimiento se producía de manera lineal a lo largo de los microtúbulos (Fig. 4.9 C). También se observó un tráfico retrógrado de las vesículas de MAL desde la membrana plasmática a la región pericentriolar.

Aparentemente el movimiento anterógrado de MAL tiene lugar a lo largo de microtúbulos que van creciendo desde el centrosoma hacia la membrana plasmática. Para profundizar más examinamos si este movimiento de MAL se produce sobre los microtúbulos preformados o si se movía junto con el extremo de crecimiento rápido (+) del microtúbulo parecido a como haría una proteína +TIP (proteínas que se unen al extremo de crecimiento del microtúbulo, e.g. EB3). Para ello cotransfectamos junto con MAL-Cherry la construcción EB3-GFP y monitorizamos su

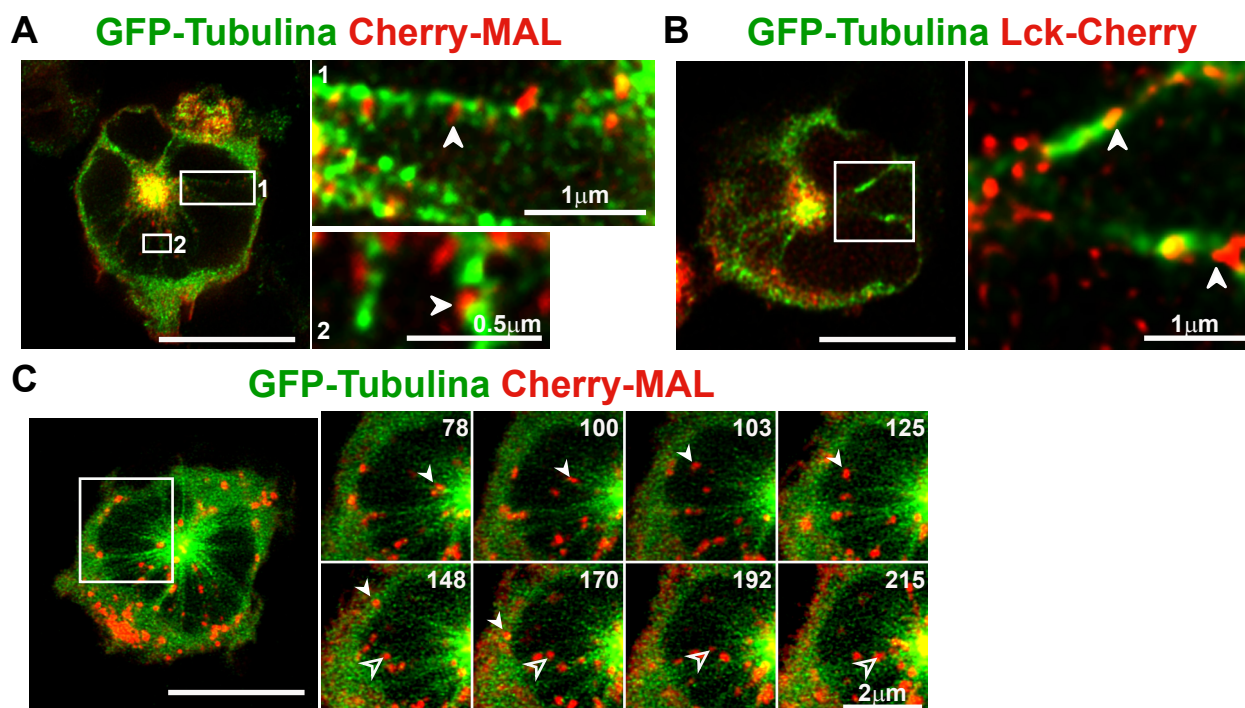


Figura 4.9. Las vesículas de MAL y Lck se mueven a lo largo de los microtúbulos. (A, B) Células Jurkat que coexpresaban GFP-tubulina y MAL-Cherry o Lck-Cherry, fueron fijadas y posteriormente analizadas por microscopía confocal. A la derecha se muestra una ampliación de las regiones enmarcadas. Las cabezas de flecha indican vesículas en movimiento a lo largo de los microtúbulos. (C) Tras 24 horas después de la transfección con GFP-tubulina y MAL-Cherry, las células fueron filmadas por videomicroscopía. Los fotogramas seleccionados corresponden a procesos ocurridos en la región enmarcada. Las flechas indican dos vesículas de MAL que se mueven desde o hacia la región pericentriolar a lo largo de microtúbulos. Los números indican tiempo en segundos. La barra de tamaño indica 5 μm si no se especifica otro valor.

movimiento por videomicroscopía (Fig. 4.10). Encontramos que las vesículas de MAL se mueven por los microtúbulos delineados por EB3, pero que no colocan con el EB3 en el extremo +, ya que el movimiento de MAL aparentemente se produce por detrás de EB3, sobre el microtúbulo ya alargado.

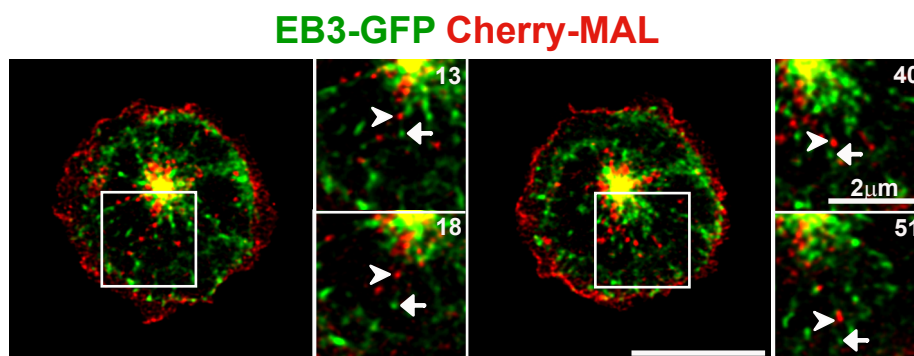


Figura 4.10. Las vesículas de MAL se mueven detrás de EB3. Células Jurkat que coexpresaban EB3-GFP y MAL-Cherry fueron analizadas por videomicroscopía. A la derecha se muestra una ampliación de las regiones enmarcadas. Las cabezas de flecha indican vesículas MAL+ y las flechas, la proteína EB3. Los fotogramas seleccionados corresponden a procesos ocurridos en la región enmarcada. Los números indican el tiempo en segundos. La barra de tamaño indica 5 μm si no se especifica otro valor.

El silenciamiento de la formina INF2 no afectó a la distribución del citoesqueleto de microtúbulos ni al de actina en células Jurkat en estado estacionario (Fig. 4.11 A, paneles superiores). Mediante videomicroscopía sobre células que expresaban simultáneamente shINF2 y EB3-GFP se observó que el silenciamiento de INF2 no afectaba a la generación de nuevos microtúbulos a partir del centrosoma (Fig. 4.11 B). De forma congruente con los efectos observados con formas constitutivamente activas de otras forminas (Ishizaki, T. *et al.*, 2001), la sobreexpresión de un mutante constitutivamente activo de INF2 (Δ DID Δ C) produjo el alineamiento de los filamentos de actina con los microtúbulos (Fig. 4.11 A, panel inferior).

Como conclusión de este conjunto de experimentos, las vesículas que transportan MAL se mueven hacia la membrana plasmática a lo largo de microtúbulos en un proceso aparentemente coordinado por INF2.

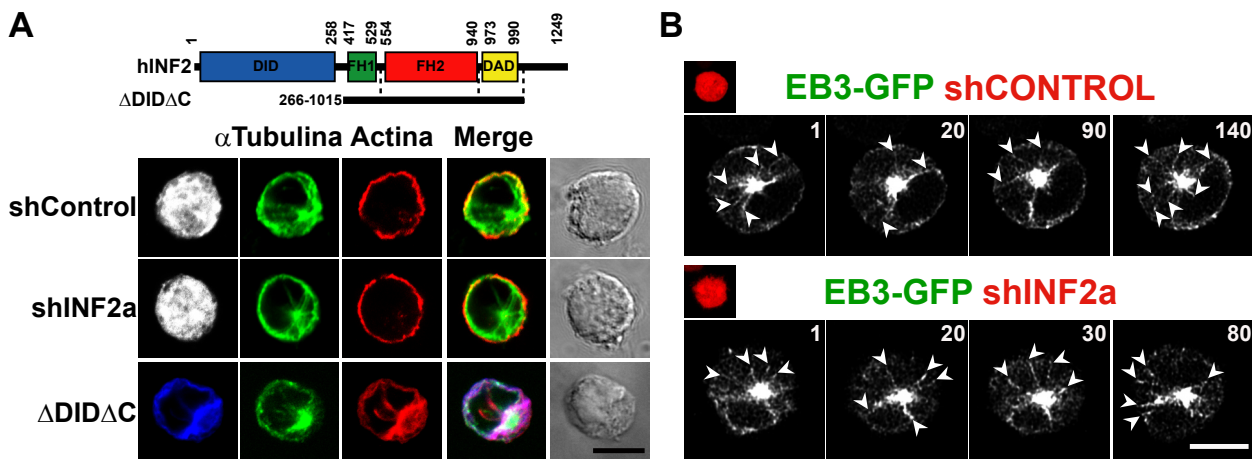


Figura 4.11. El silenciamiento de INF2 no afecta a la distribución de los citoesqueletos de actina o tubulina. (A) Células que expresaban shINF2a o la construcción Δ DID Δ C fueron fijadas y teñidas para tubulina, F-actina e INF2. (B) Células que coexpresaban la proteína Cherry y shControl o shINF2a a partir del mismo plásmido se transfectoron con EB3-GFP y fueron filmadas por videomicroscopía. Las flechas señalan a EB3 en el extremo de crecimiento del microtúbulo. Los números indican tiempo en segundos. La barra de tamaño indica 5 μ m.

5. Las actividades polimerizadora y despolimerizadora de INF2 son necesarias para el transporte de Lck a la membrana plasmática

La polimerización de filamentos de actina controla el movimiento de vesículas intracelulares, así como de patógenos intracelulares. La mutación de la Lys¹⁶⁰¹ que está dentro del dominio FH2 de la formina de levaduras Bnp1 o en la posición equivalente en mDia2 (Bartolini, F. *et al.*, 2008) afecta a la actividad nucleadora de actina de estas forminas. Por otro lado, la mutación de tres residuos de leucina en el dominio DAD de INF2 anula su actividad despolimerizadora de actina *in vitro* (Chhabra, E.S. y Higgs, H.N., 2006).

Teniendo en cuenta estos antecedentes quisimos estudiar la implicación de las actividades tanto polimerizadora como despolimerizadora de INF2 en el transporte de Lck a membrana plasmática. Para ello introdujimos las mismas mutaciones en las posiciones equivalentes de la

proteína humana INF2 para generar las construcciones mutantes: K/A (mutación de la Lys por Ala en el dominio FH2 de INF2), 3L/A (mutación de las tres Leu por Ala en el dominio DAD) y K/A-3L/A (con ambas regiones mutadas) (Fig. 4.12 A), y se utilizaron para determinar si eran capaces de reemplazar la función de la proteína INF2 endógena en el transporte de Lck (Fig. 4.12 B). Para ello los transcritos que codifican estas INF2 exógenas fueron diseñados para resistir la expresión de shINF2b, que está dirigido contra la región 3' no traducida del ARNm del INF2 endógeno. A diferencia de la construcción INF2-1 intacta, ninguno de los mutantes fue capaz de restaurar el transporte de Lck en las células silenciadas para la INF2 endógena. Esto nos indica que tanto la actividad polimerizadora como la despolimerizadora de actina de INF2 son necesarias para el transporte correcto de Lck a la membrana plasmática.

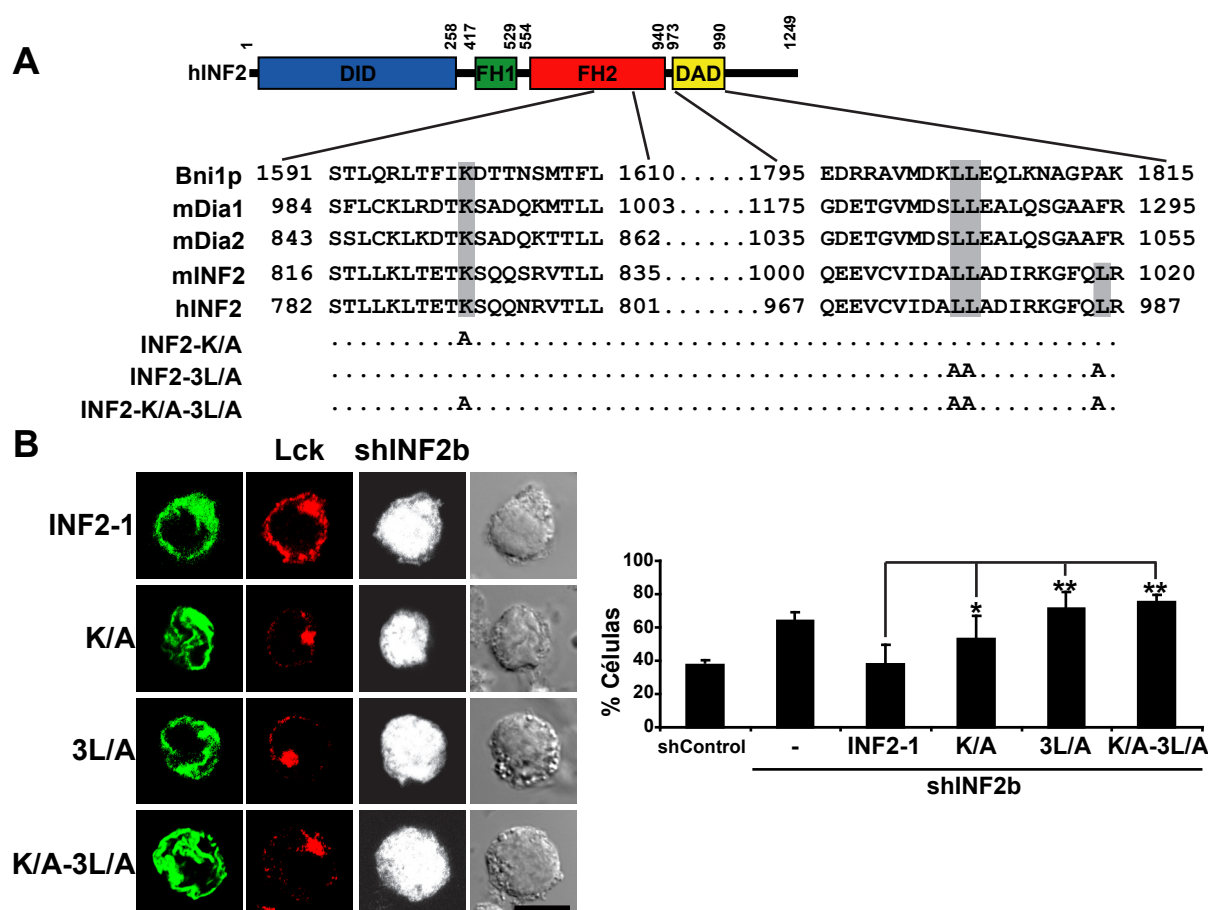


Figura 4.12. Las actividades polimerizadora y despolimerizadora de INF2 son necesarias para la expresión de Lck en membrana plasmática. (A) Alineamiento que muestra la conservación del residuo Lys1601 del dominio FH2 de Bni1p en mDia1, mDia2, mINF2 y hINF2, y la posición de los tres residuos críticos de Leu para la actividad despolimerizadora de actina en el DAD de INF2. Nótese que las tres Leu no están presentes ni en Bni1p ni en mDia1-2. Los residuos mutados K/A, 3L/A, K/A-3L/A en INF2-1 se indican en el esquema. (B) Células Jurkat con niveles silenciados de INF2 por la expresión de shINF2b (visualizadas por la co-expresión de GFP) fueron transfectadas con plásmidos de expresión que codificaban para INF2-1 intacta o con las mutaciones indicadas. Tras su fijación y permeabilización, las células fueron teñidas para Lck. El histograma muestra el porcentaje medio \pm SEM de células con niveles bajos de Lck en membrana (*, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$). La barra de tamaño indica 5 μ m.

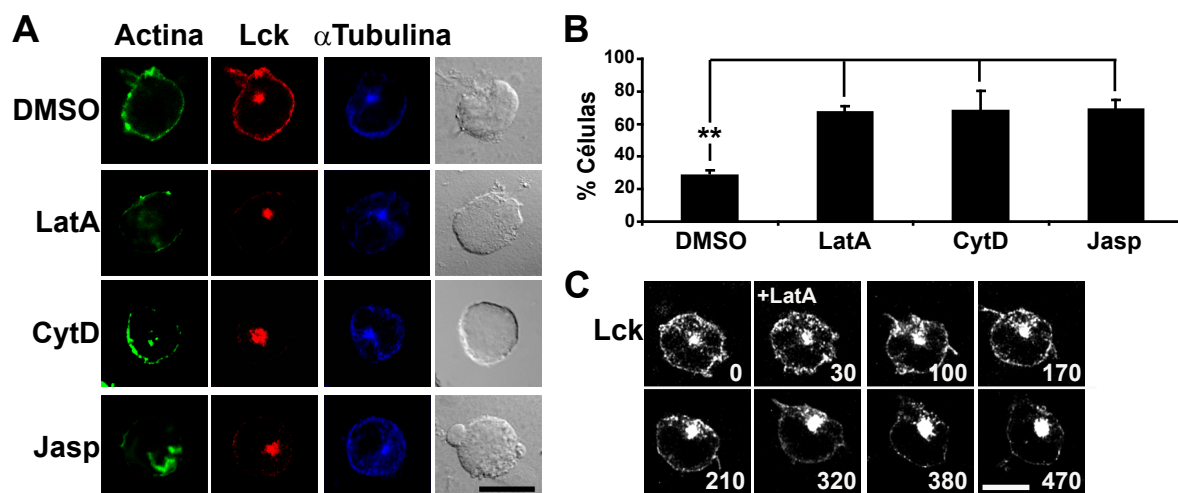


Figura 4.13. La dinámica de actina es necesaria para el transporte exocítico de Lck. (A) Células Jurkat fueron tratadas con 0,1% DMSO, 1 μ M latrunculina A (LatA), 2,5 μ M citocalasina D (CytD) o 0,5 μ M jasplakinolide (Jasp) durante 1 hora. Posteriormente, las células fueron fijadas, permeabilizadas y teñidas para F-actina, Lck y α -tubulina. (B) El histograma muestra el porcentaje medio \pm SEM de células con niveles bajos de Lck en la periferia celular. Se llevaron a cabo tres experimentos independientes (**, $p < 0,01$). (C) Células Jurkat que expresaban Lck-GFP durante 24 horas fueron tratadas con LatA tras 30 segundos de haberse iniciado la filmación. Los números indican el tiempo en segundos. La barra de tamaño indica 5 μ m.

Para ahondar en el estudio de la implicación de la dinámica de actina en el transporte de Lck, examinamos el efecto del tratamiento de las células Jurkat con distintas drogas que producen la despolimerización (latrunculina A y citocalasina D) o la estabilización de los filamentos de actina (jasplakinolide) (Fig. 4.13 A, B). En todos los casos se observó la reducción de los niveles de Lck en la membrana plasmática y su consiguiente acumulación intracelular. Este efecto de los inhibidores de la dinámica de actina se producía de forma gradual como se comprobó por videomicroscopía tras el tratamiento de las células con latrunculina A (Fig. 4.13 C).

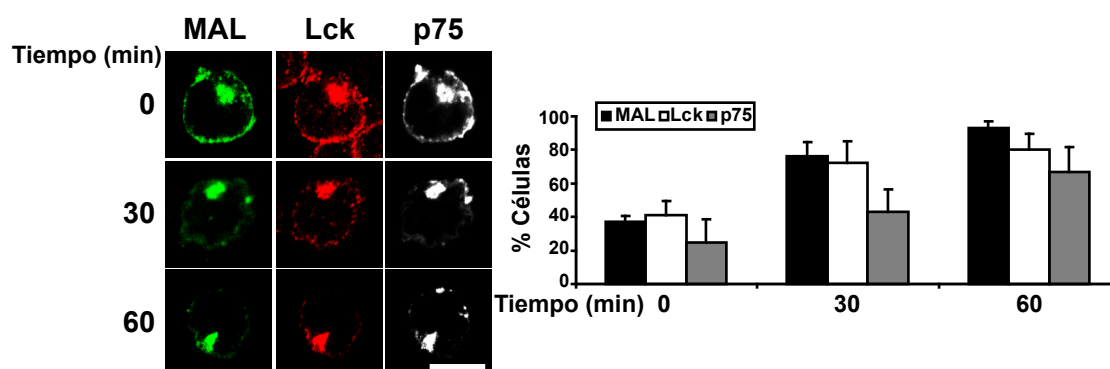


Figura 4.14. La integridad del citoesqueleto de tubulina es necesaria para la expresión de Lck y MAL en la membrana plasmática. Células Jurkat que expresaban MAL-Cherry (coloreada en verde) y p75-GFP (coloreada en gris) se trataron con 100 μ M nocodazol durante los tiempos indicados. Las células fueron fijadas, permeabilizadas y teñidas para Lck (coloreada en rojo). El histograma muestra el porcentaje medio de células \pm SEM con niveles bajos de MAL, Lck o p75 en la membrana plasmática. Se llevaron a cabo tres experimentos independientes. La barra de tamaño indica 5 μ m.

Mediante el tratamiento de las células con nocodazol, una droga que causa la despolimerización de los microtúbulos, se observó que el citoesqueleto de tubulina también es necesario para el transporte de MAL y de Lck a la membrana plasmática (Fig. 4.14). La distribución de p75, que es sensible a nocodazol (Formaggio, E. *et al.*, 2008), fue analizada como control del experimento. Este resultado es coherente con los resultados mostrados anteriormente que indicaban que las vesículas que transportan MAL y Lck se mueven a través de microtúbulos.

Se concluye que, tanto el citoesqueleto de actina como el de tubulina son necesarios para el transporte de Lck a membrana plasmática.

6. Cdc42 y Rac1 son necesarias para el transporte de Lck a la membrana plasmática

Las forminas Drf son activadas por la unión de proteínas de la familia de las RhoGTPasas a su extremo amino terminal impidiendo la interacción de éste con el dominio DAD situado en el extremo carboxilo terminal. Para identificar la(s) RhoGTPasa(s) responsable(s) de la activación de INF2 llevamos a cabo ensayos de “pull-down” utilizando lisados de células Jurkat en los que las RhoGTPasas endógenas fueron cargadas o no con un análogo no hidrolizable de GTP. Tanto Rac1 como Cdc42 se unieron al dominio DID de INF2 en ambas condiciones pero la unión fue mayor con la forma activa de la RhoGTPasa cargada con GTP (Fig. 4.15). No se detectó unión a RhoA. Resultados similares han sido descritos utilizando lisados de células HepG2 (Madrid, R. *et al.*, 2010).

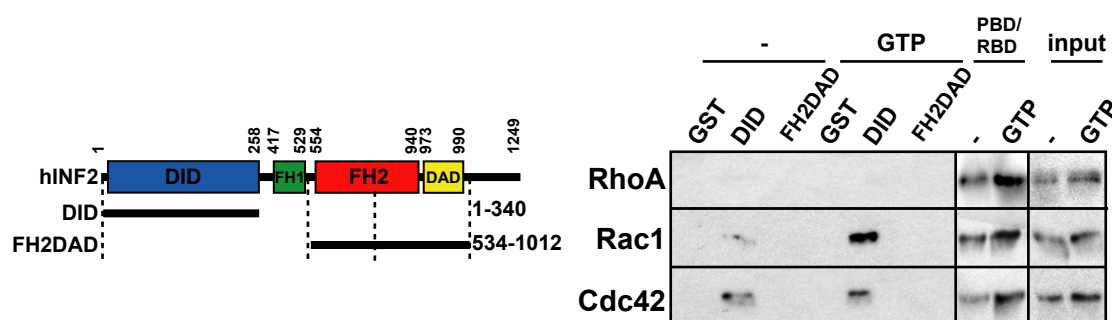


Figura 4.15. INF2 se une a Rac1 y a Cdc42. Extractos celulares de Jurkat fueron cargados o no con el análogo no hidrolizable de GTP, GMP-PNP, e incubados con GST sola o fusionada a los fragmentos de INF2 indicados en el esquema. Como controles del ensayo se utilizaron el dominio de unión a RhoA de la Rotekina (RBD) y el de unión a Rac1 y Cdc42 de PAK1 (PBD). Se analizó en paralelo un 10% del extracto original (input).

El silenciamiento de Rac1 y Cdc42, pero no de RhoA, recapituló los efectos del silenciamiento de INF2 o MAL en el transporte de Lck a la membrana plasmática, produciendo una acumulación de Lck en la región pericentriolar y una reducción de sus niveles en la membrana plasmática (Fig. 4.16 A, B y D). El doble silenciamiento de Rac1 y Cdc42 aumentó ligeramente el número de células con niveles bajos de Lck en membrana comparados con los silenciamientos individuales, indicando que pudieran actuar en momentos diferentes del transporte. Para profundizar

en el papel de Rac1 y Cdc42 en este proceso utilizamos la expresión de formas constitutivamente activas (V12) y de dominantes negativas (N17) de estas dos RhoGTPasas (Fig. 4.16 C y D).

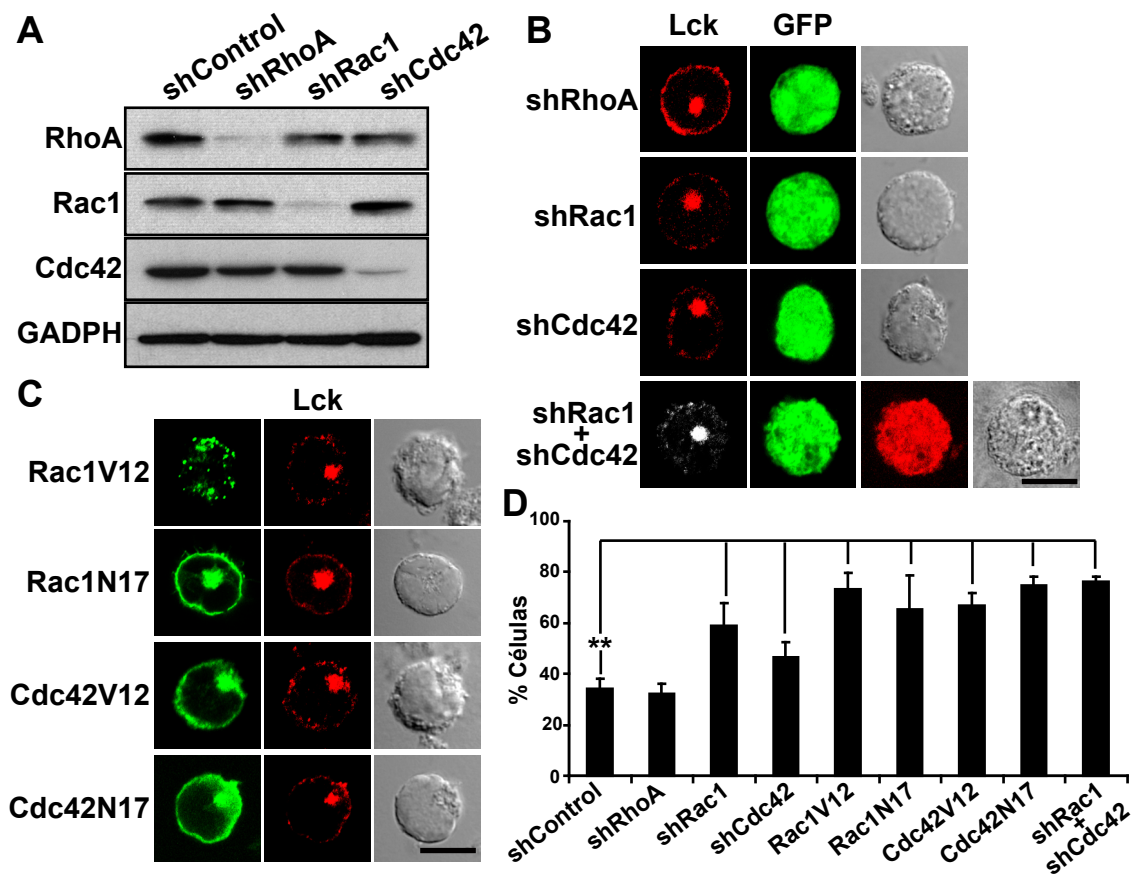


Figura 4.16. Rac1 y Cdc42 son necesarias para el transporte de Lck a membrana plasmática. (A) Células Jurkat que expresaban shARN control o contra las proteínas RhoA, Rac1 y Cdc42 fueron analizadas por inmunotransferencia con anticuerpos contra las proteínas indicadas. Como control de carga se usó GAPDH. (B) Estas células fueron fijadas, permeabilizadas e incubadas con un anticuerpo anti-Lck. También se analizaron doble transfectantes que expresaban shRac1-GFP y shCdc42-Cherry de forma simultánea. (C) Células Jurkat que expresaban durante 24 horas Rac1V12, Cdc42V12, Rac1N17 o Cdc42N17 fusionadas a GFP se tiñeron para Lck. (D) Cuantificación del porcentaje medio \pm SEM de células con niveles bajos de Lck en membrana plasmática. La intensidad de la marca fue medida en al menos 50 células por experimento. Se llevaron a cabo cuatro experimentos independientes (**, $p < 0,01$). La barra de tamaño indica 5 μ m.

En todos los casos se observó una acumulación de Lck en el compartimento intracelular y niveles de expresión muy bajos en la membrana plasmática, al igual que con el silenciamiento de Rac1 o de Cdc42. De forma coherente con la interacción de Rac1 y Cdc42 con INF2 observada en los experimentos de “pull-down”, se encontró que tanto Rac1 como Cdc42 colocalizan parcialmente con INF2 (Fig. 4.17)

Deducimos que Cdc42 y Rac1, pero no RhoA, se unen a INF2 y son requeridas para el transporte de Lck a la membrana plasmática. Además, de forma congruente con el requerimiento de la dinámica de actina, estas dos GTPasas deben permanecer en un estado dinámico ya que tanto las formas constitutivamente activas como los dominantes negativos producen la acumulación intracelular de Lck.

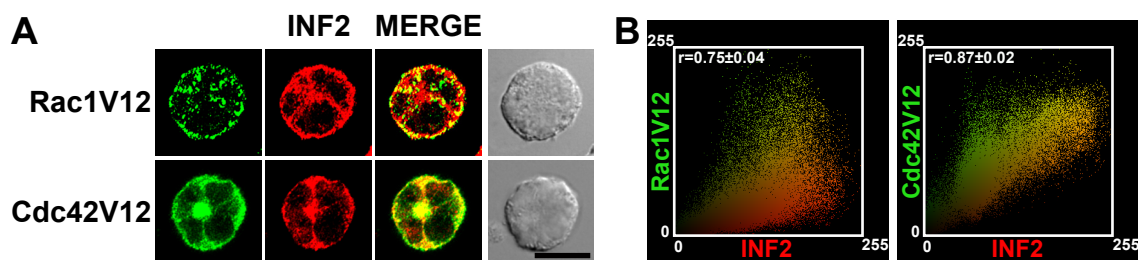


Figura 4.17. Rac1 y Cdc42 colocalizan parcialmente con INF2. (A) Células Jurkat transfectadas con las construcciones activas fusionadas a GFP de Rac1V12 y Cdc42V12 fueron teñidas para INF2 endógeno. Las imágenes mostradas fueron deconvolucionadas. (B) Gráficos de colocalización de Rac1V12 y Cdc42V12 con INF2. El coeficiente de correlación de Pearson (r) fue de 0,75 y 0,87 para Rac1V12/INF2 y Cdc42V12/INF2, respectivamente. La barra de tamaño indica 5 μ m.

7. El transporte de Lck en linfocitos T primarios está regulado de la misma forma que en células Jurkat

Puesto que las células Jurkat son una línea celular establecida, quisimos estudiar si los efectos observados se producen también en células T primarias. Para ello aislamos linfocitos de sangre periférica (PBLs) obtenidos de un donante sano, y los utilizamos para silenciar la expresión de INF2, Cdc42, Rac1 y MAL (Fig. 4.18 A). Mientras que en las células control Lck en PBLs se encuentra mayoritariamente en la membrana plasmática, el silenciamiento individual de las proteínas estudiadas indujo la disminución de la expresión de Lck en la periferia celular y su acumulación intracelular (Fig. 4.18 B). Por consiguiente, tanto en células Jurkat como en linfocitos T primarios en estado estacionario, INF2, Cdc42 y Rac1 son necesarias para que Lck se localice en la membrana plasmática (Andres-Delgado, L. *et al.*, 2010).

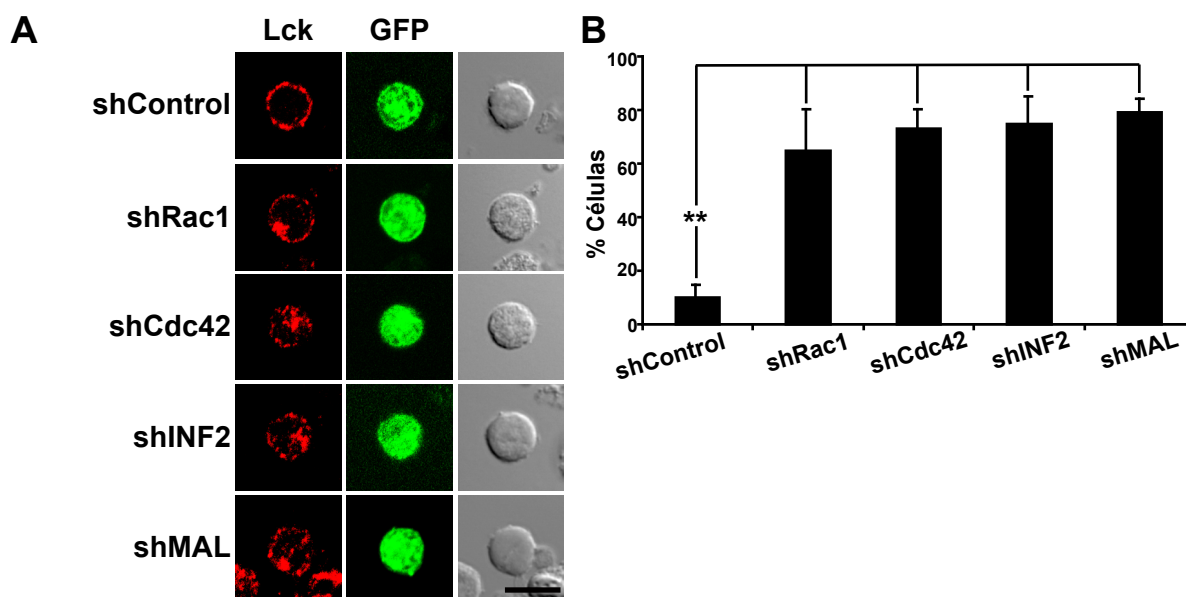


Figura 4.18. Cdc42, Rac1 e INF2 son necesarias para la distribución normal de Lck en la membrana plasmática de células T primarias. (A) Células T primarias aisladas de un individuo sano que co-expresan GFP y shARN contra Rac1, Cdc42, INF2 o MAL en el mismo plásmido, se fijaron, permeabilizaron y tiñeron para Lck. (B) Histograma que muestra el porcentaje medio \pm SEM de células T con acumulación intracelular de Lck. Se analizaron 50 células por experimento. Se llevaron a cabo tres experimentos independientes (**, $p < 0,01$). La barra de tamaño indica 5 μ m.

8. La formina INF2 es necesaria para la reorientación del centrosoma hacia la SI

Los linfocitos T son células esféricas que en estado estacionario no presentan polaridad aparente. La activación de la célula T al reconocer un antígeno presentado por una APC en el contexto de moléculas del MHC lleva a la polarización de ciertas moléculas y compartimentos de la célula T hacia la zona de unión formándose una SI. Un caso particular de presentación antigénica tiene lugar con los superantígenos. Éstos son un grupo de productos bacterianos y virales que estimulan a los linfocitos T sin necesidad de procesamiento. Son presentados por el MHC de clase II, al que se unen en zonas distintas que los antígenos peptídicos convencionales. Reconocen la zona variable de la cadena β del TCR, y es el subtipo de esta cadena lo que dota a los linfocitos T de especificidad de respuesta frente a los distintos superantígenos. En el caso del SEE, que es el utilizado en los experimentos siguientes, se produce por TCRs portadores de la región V β 8.

La proteína INF2 endógena en células Jurkat conjugadas con células Raji cargadas con SEE se localiza en la periferia de la célula, la región pericentriolar y los microtúbulos, de igual manera que en estado estacionario. El acúmulo interno se polariza hacia la zona de SI junto con el centrosoma y la actina (Fig. 4.19). La expresión exógena de las formas completas de las isoformas de INF2-1 y 2 reproduce la distribución endógena en los conjugados.

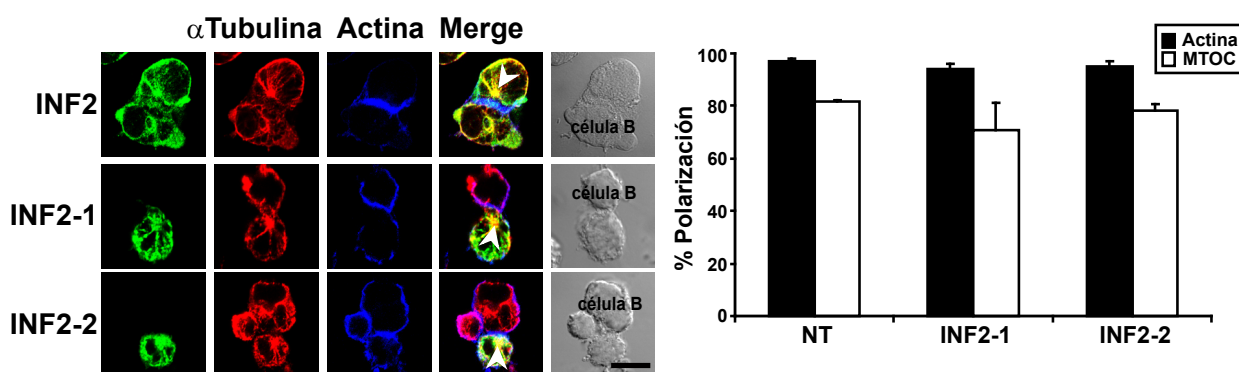


Figura 4.19. INF2 se polariza hacia la SI. Se conjugaron células Jurkat que expresaban o no las proteínas completas de INF2 acopladas a GFP con células Raji en presencia de SEE durante 15 min. Se fijaron los conjugados, se permeabilizaron con Tritón X-100 y se tiñeron para α -tubulina y F-actina. Las flechas indican la posición del centrosoma en la célula T. Las células B se identifican en la imagen del contraste de fases. El histograma muestra el porcentaje medio \pm SEM de de células T en los conjugados en los que la F-actina o el centrosoma (MTOC) de la célula T está polarizados hacia la SI. Se llevaron a cabo tres experimentos independientes y se analizaron 50 células por experimento. La barra de tamaño indica 5 μ m.

Los experimentos previos realizados en el laboratorio (Anton, O. *et al.*, 2008) mostraron que la proteína MAL es necesaria para la formación de una SI normal. La polarización de moléculas tales como el TCR/CD3, LFA-1 o estructuras como el centrosoma se veía afectada por el silenciamiento de MAL. La proteína Lck también era incapaz de polarizarse hacia la SI en ausencia de MAL. Teniendo en cuenta los antecedentes que indicaban una unión directa de MAL e INF2 y un papel funcional de ambas en el transporte exocítico de Lck, estudiamos si la formina INF2 es necesaria para la localización de Lck en la SI (Fig. 4.20). Al igual a lo que ocurre con

MAL, el silenciamiento de la expresión de INF2 impidió el acceso de Lck a la SI.

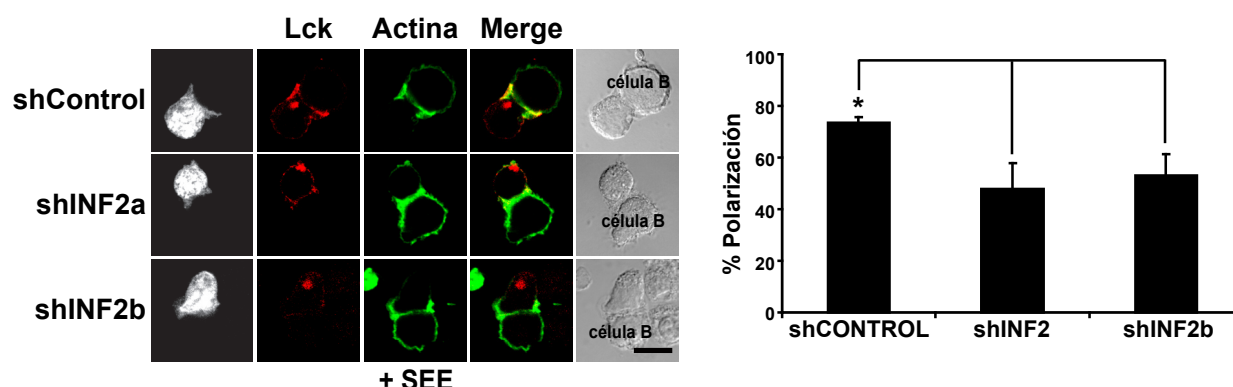


Figura 4.20. La formina INF2 es necesaria para la polarización de Lck a la SI. Se conjugaron células Jurkat transfectadas con GFP y shControl, shINF2a o shINF2b en el mismo plásmido. Se fijaron los conjugados, se permeabilizaron y se tiñeron para Lck y F-actina. Las células B se identifican en el contraste de fases. El histograma muestra el porcentaje medio \pm SEM de conjugados en los que la proteína Lck de membrana está polarizada a la SI. Se llevaron a cabo tres experimentos independientes (*, $p < 0,05$) y se analizaron 50 células por experimento. La barra de tamaño indica 5 μ m.

Puesto que la reorientación del centrosoma a la SI requiere la expresión de MAL (Anton, O. *et al.*, 2008), estudiamos si INF2 era también requerido para este proceso. La reducción de los niveles de INF2 mediante la expresión de shINF2a y b produjo un descenso considerable del número de células T en las que el centrosoma estaba próximo a la SI (Figura 4.21 A, C). Por el contrario, la proteína ICAM-1 no necesitó de la expresión de INF2 para polarizarse a la SI (Fig. 4.22 B,D), mientras que la polarización del TCR se comportó como la del centrosoma (Fig. 4.22 A

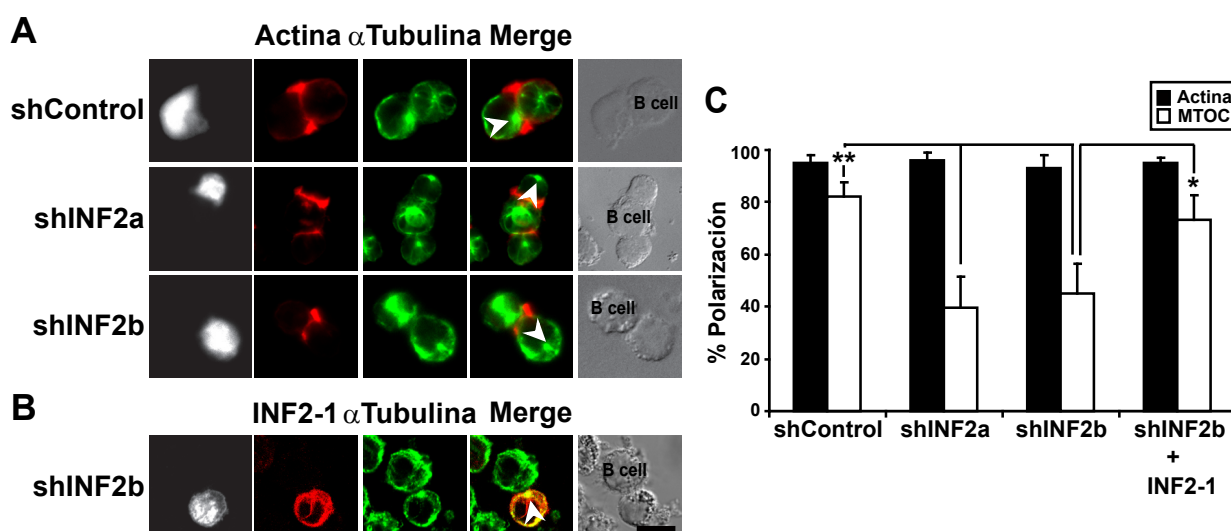


Figura 4.21. INF2 es necesaria para la reorientación del centrosoma a la SI. (A) Se conjugaron células Jurkat que expresaban GFP y shControl, shINF2a o shINF2b con células Raji en presencia de SEE. Se fijaron las células, se permeabilizaron y se tiñeron para α -tubulina y F-actina. Las cabezas de flecha indican la posición del centrosoma de la célula T. (B) Células Jurkat que expresaban shINF2b e INF2-1-Cherry se conjugaron a células Raji en presencia de SEE. Las células fueron teñidas para α -tubulina. (C) El histograma muestra el porcentaje medio \pm SEM de células T en conjugados con el centrosoma (MTOC) reorientado a la SI. Se llevaron a cabo tres experimentos independientes y se analizaron 50 células por experimento (*, $p < 0,05$). La barra de tamaño indica 5 μ m.

y D). La expresión de la construcción de la proteína INF2-1 entera en las células Jurkat silenciadas restauró en gran medida la polarización del centrosoma a la SI (Fig. 4.21 B,C) y del TCR a la SI (Fig. 4.22 C y D).

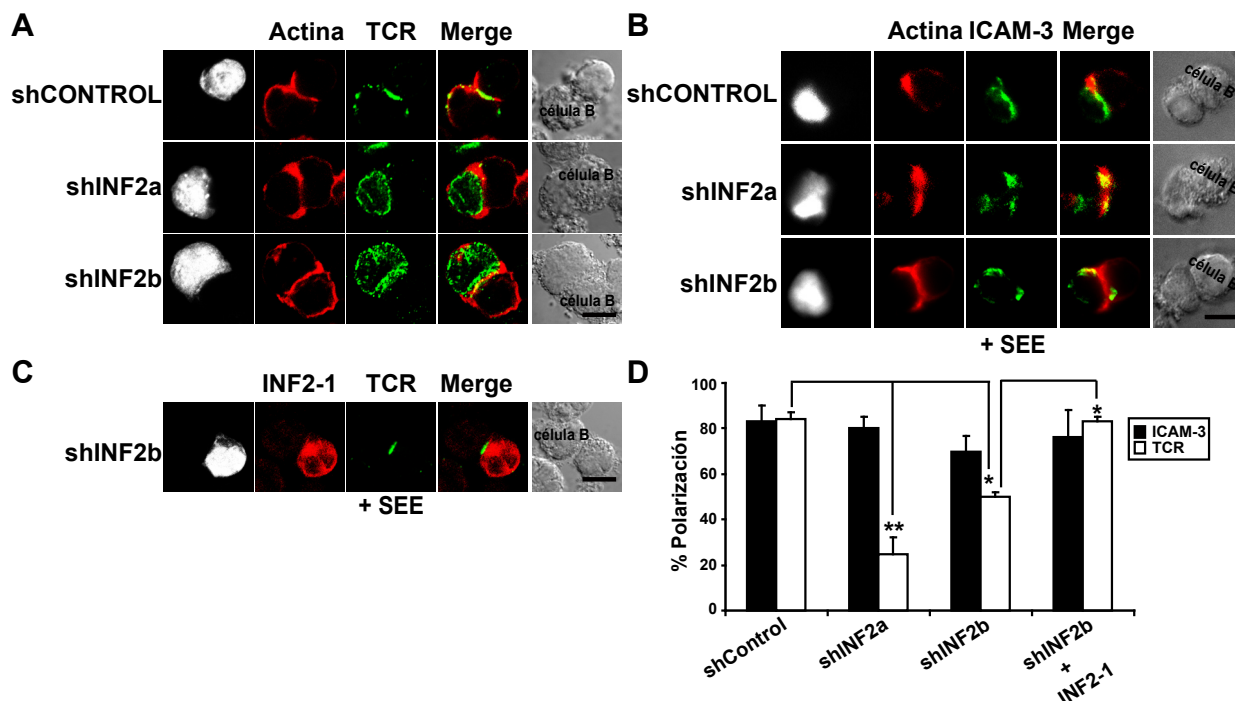


Figura 4.22. INF2 es necesaria para la polarización del TCR a la SI. (A) Se conjugaron células Jurkat transfectadas con shControl, shINF2a o shINF2b, con células Raji en presencia de SEE. Las células fueron teñidas para el TCR y F-actina. (B) Los mismos conjugados se tiñeron para ICAM-3 y F-actina. (C) Células Jurkat co-transfectadas con shINF2b y la construcción INF2-1-Cherry se conjugaron en presencia de SEE. Las células se tiñeron para el TCR. (D) Histograma que muestra la cuantificación del porcentaje medio \pm SEM de células Jurkat en conjugados con el TCR o ICAM-3 polarizados a SI. Se llevaron a cabo tres experimentos independientes y se analizaron 50 células por experimento (*, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$). La barra de tamaño indica 5 μ m.

Para profundizar en los efectos de INF2 sobre la SI se analizaron por videomicroscopía células silenciadas que expresaban de forma transitoria las proteínas GFP-actina (Fig. 4.23 A) o GFP-tubulina (Fig. 4.23 B). La polimerización de actina en la SI no requirió la expresión de INF2 ya que tras el contacto con la APC la actina rápidamente se polarizó a la zona de contacto en las células Jurkat silenciadas para INF2. Sin embargo, el centrosoma que partiendo de una localización central en el linfocito T se movió a la zona de sinapsis en las células control, permaneció en una posición central sin llegar a contactar con la zona de la SI en las células silenciadas para INF2.

Para averiguar si los efectos observados en la formación de la SI en las células silenciadas para INF2 eran atribuibles a la expresión deficiente de Lck en la periferia celular, se forzó la expresión de Lck en la membrana plasmática mediante la expresión de una quimera CD4/Lck. Esta construcción expresa el dominio extracelular y transmembrana de la proteína CD4 murina, fusionada al extremo N-terminal de la proteína Lck. La detección de la quimera se realizó con un anticuerpo específico contra el CD4 murino, distinguiéndola así del CD4 endógeno humano. La expresión de Lck en la membrana plasmática en las células silenciadas para INF2 consiguió restaurar la polarización del TCR, pero no la reorientación del centrosoma (Fig. 4.24). Así, aunque

la ausencia de Lck en la membrana plasmática es posiblemente una de las causas principales de los efectos observados en la SI formada por las células Jurkat deficientes en INF2, este resultado indica que no es la única causa ya que el centrosoma permanece sin reorientar incluso en estas condiciones.

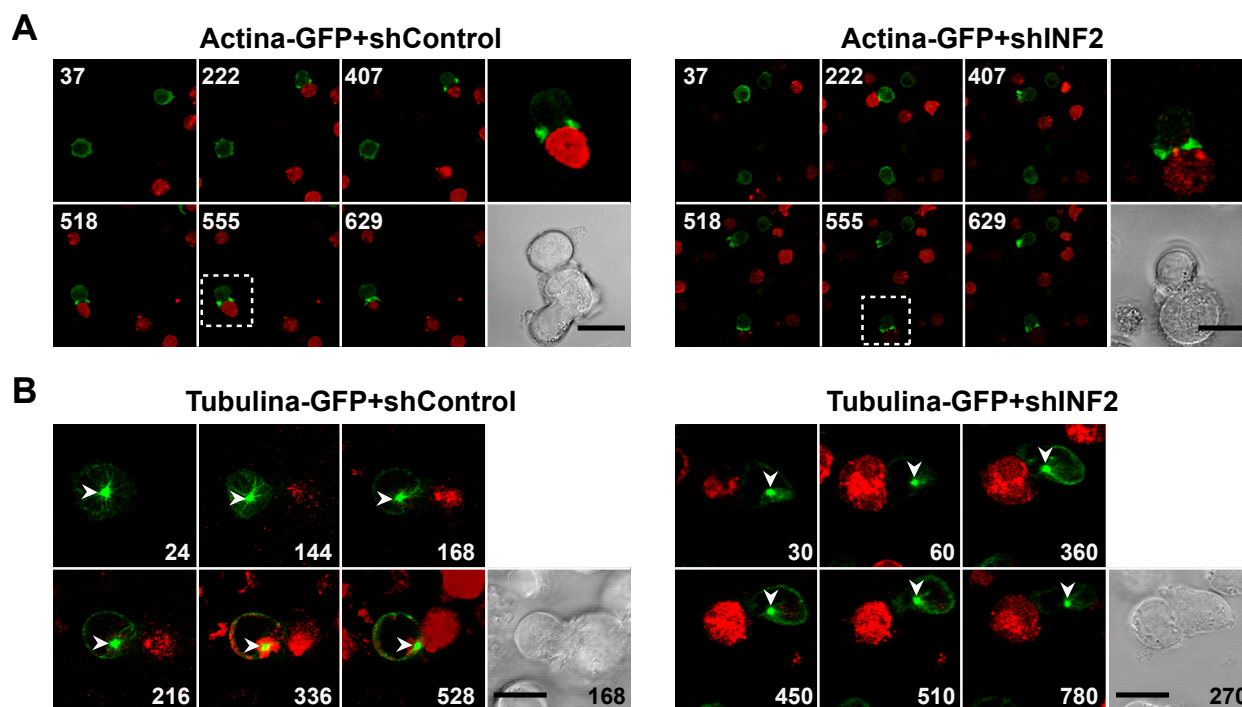


Figura 4.23. Videomicroscopía de la actina y del centrosoma en células silenciadas para INF2 durante la formación de la SI. (A) Células Jurkat silenciadas (shINF2a) o no (shControl) para INF2 y que expresaban de forma transitoria GFP-actina se conjugaron con células Raji (marcadas con la sonda roja CMTMR) cargadas con SEE y fueron analizadas por videomicroscopía. A la derecha se muestra una ampliación del conjugado enmarcado. (B) En este caso las células silenciadas para INF2 expresaban GFP-tubulina. Las flechas indican la posición del centrosoma en los distintos fotogramas. Los números indican el tiempo en segundos. La barra de tamaño indica 5 μ m.

9. La polarización del centrosoma no requiere las actividades polimerizadora/despolarizadora de actina de INF2

Teniendo en cuenta la peculiaridad de la formina INF2, que *in vitro* es capaz de despolimerizar actina además de polimerizarla, quisimos estudiar si estas actividades eran necesarias para la reorientación del centrosoma. Para ello se expresó shINF2b para reducir los niveles de INF2 endógeno junto con los mutantes K/A (deficiente en polimerización de actina), 3L/A (deficiente en despolimerización de actina) y K/A-3L/A (deficiente en polimerización y despolimerización de actina) de INF2-1 (Fig. 4.25 A) y se cuantificó la reorientación del centrosoma. Los tres mutantes de INF2 utilizados restauraron la reorientación del centrosoma (Fig. 4.25 B y C). En otras palabras, las actividades de INF2 relacionadas con su actividad sobre la actina no parecen influir en la capacidad del centrosoma para dirigirse a la SI.

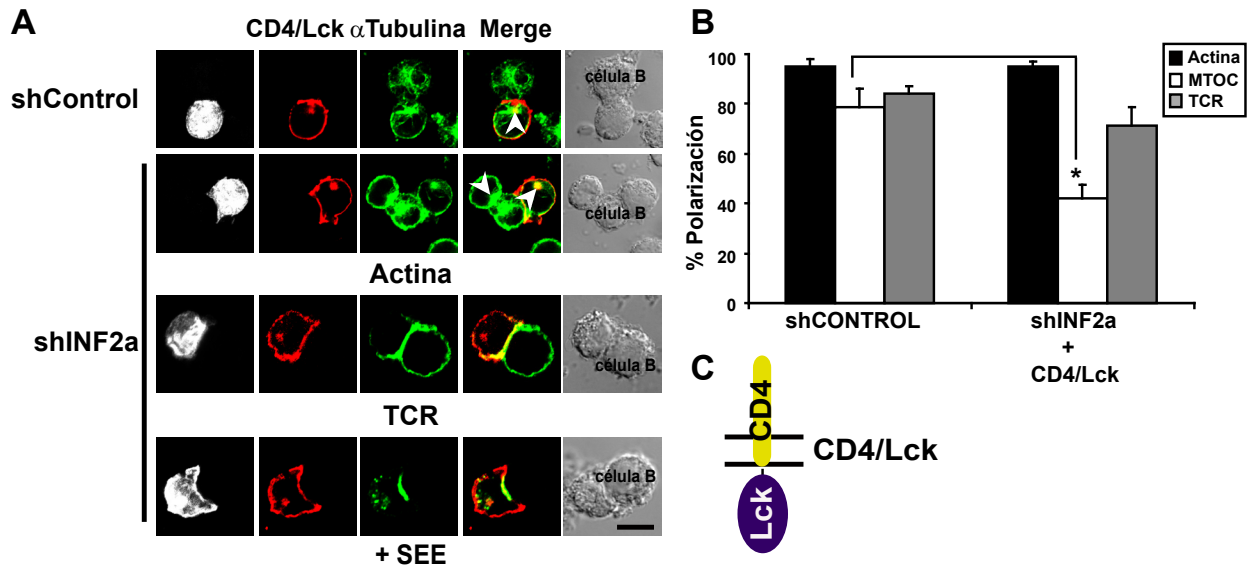


Figura 4.24. La expresión forzada de Lck en la membrana plasmática no restaura la reorientación del centrosoma a la SI. (A) Jurkat que expresaban shControl o shINF2a se transfectaron con la quimera CD4/Lck. La quimera se detectó con anti-CD4 murino y las células fueron teñidas también para α -tubulina, F-actina o el TCR. Las flechas indican la posición del centrosoma de la célula T. (B) El histograma muestra el porcentaje medio \pm SEM de células T con actina, el centrosoma (MTOC) o el TCR polarizados a la SI. Se llevaron a cabo tres experimentos independientes y se analizaron 50 células por experimento (*, $p < 0,05$). La barra de tamaño indica 5 μ m. (C) Esquema de la quimera CD4/Lck utilizada.

Para corroborar estos resultados de forma independiente, tratamos las células Jurkat con drogas (latrunculina A y citocalasina D, jasplakinolide) que afectan al citoesqueleto de actina. En ninguno de los casos la reorientación del centrosoma se vio afectada, concluyéndose por lo tanto

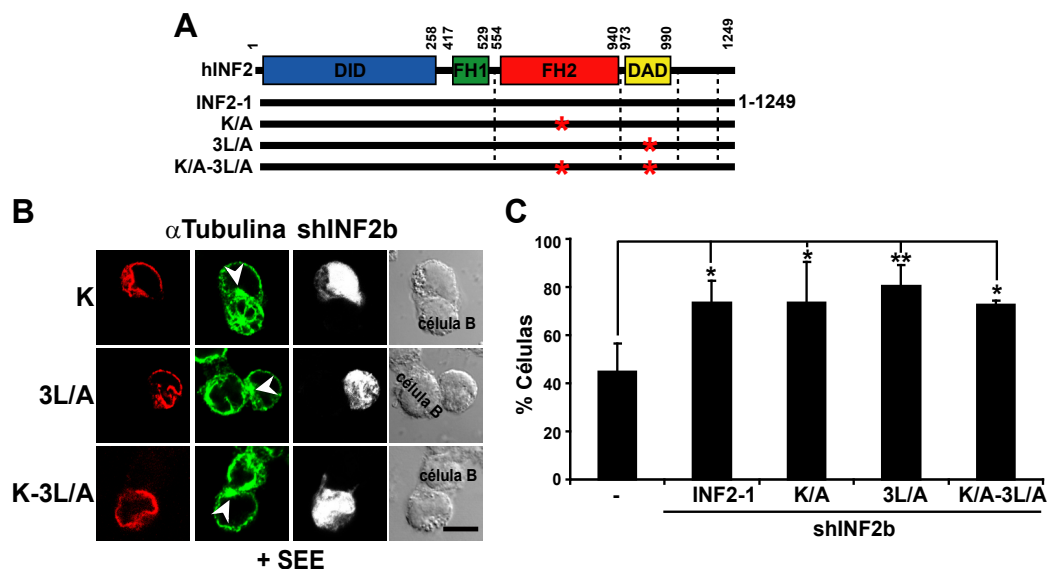


Figura 4.25. La reorientación del centrosoma es independiente de las actividades polimerizadora/despolimerizadora de actina de INF2. (A) Esquema con las construcciones mutadas utilizadas. Los asteriscos indican los lugares de las mutaciones críticas dentro de INF2-1. (B) Células Jurkat con la expresión de INF2 silenciada con shINF2b fueron transfectadas con plásmidos que expresaban la proteína INF2-1 entera o los mutantes K/A, 3L/A o K/A-3L/A fusionados a la proteína Cherry. Posteriormente se conjugaron con células Raji cargadas con SEE y tras 15 min se tiñeron para α -tubulina. Las flechas indican la posición del centrosoma de la célula T. (C) Histograma que muestra el porcentaje medio \pm SEM de células T en conjugados con el centrosoma reorientado a la SI. Se llevaron a cabo tres experimentos independientes y se analizaron 50 células por experimento (*, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$). La barra de tamaño indica 5 μ m.

que la dinámica de actina no es necesaria para que se produzca este proceso. Por el contrario, el tratamiento de las células Jurkat con nocodazol, que como se ha comentado anteriormente induce la despolimerización de los microtúbulos, inhibía la reorientación del centrosoma a la SI como pudo observarse tiñendo las células para γ -tubulina, una isoforma de tubulina específica del centrosoma (Fig. 4.26).

Como resumen de este apartado concluimos que ni las actividades polimerizadora/despolimerizadora de INF2 ni la dinámica de actina es requerida para que se produzca de forma eficiente la polarización del centrosoma a la SI pero que, sin embargo, este proceso requiere la integridad de los microtúbulos.

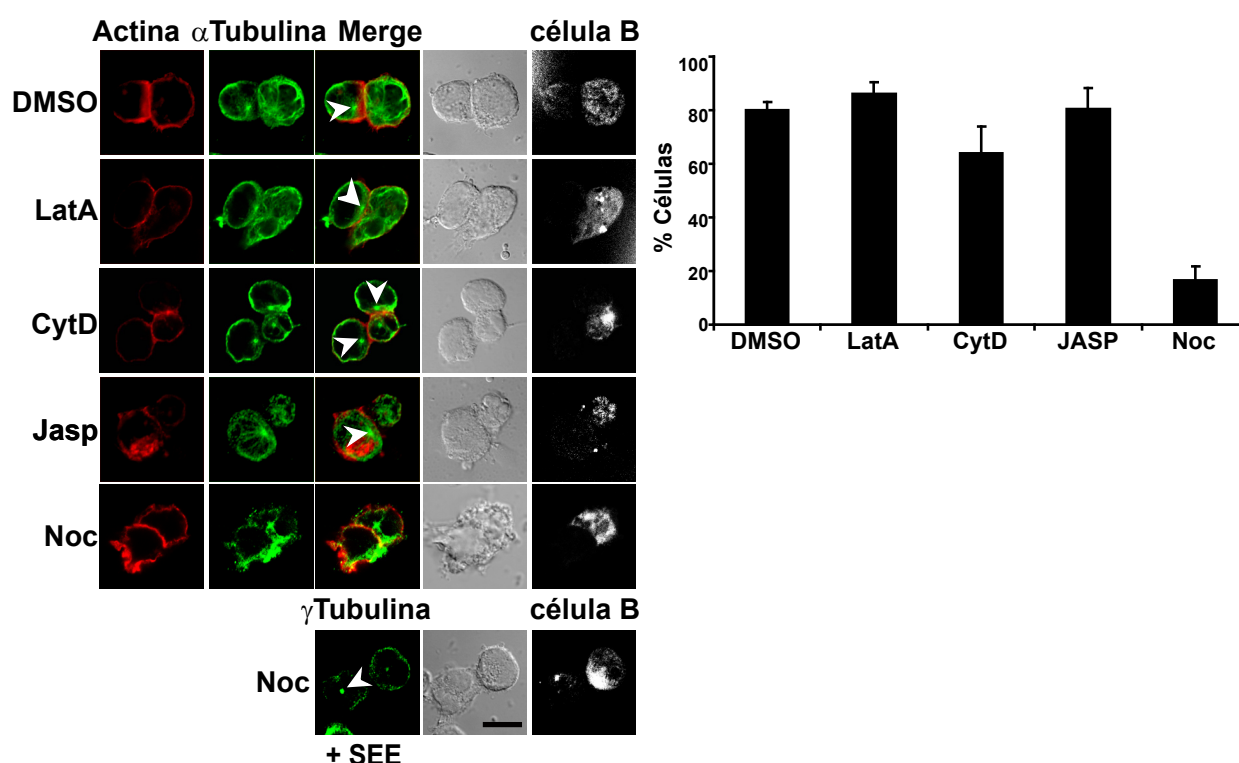


Figura 4.26. La dinámica de actina no es necesaria para la reorientación del centrosoma. Células Jurkat fueron tratadas con 0,1% DMSO, 1 μ M latrunculina A (LatA), 2,5 μ M citocalasina D (CytD), 0,5 μ M jasplakinolide (Jasp) o 100 μ M de nocodazol durante 1 hora. Posteriormente, las células fueron conjugadas en presencia de SEE, fijadas y teñidas para F-actina y α -tubulina ó γ -tubulina. Las células B fueron previamente marcadas con la sonda CMTMR para facilitar su identificación. Las flechas indican la posición del centrosoma de la célula T. El histograma muestra el porcentaje medio \pm SEM de células T con el centrosoma reorientado hacia la SI. Se llevaron a cabo tres experimentos independientes y se analizaron 50 células por experimento. La barra de tamaño indica 5 μ m.

10. El dominio FH2 de INF2 es capaz de restaurar el proceso de reorientación del centrosoma hacia la SI

El silenciamiento de INF2 impide al centrosoma reorientarse hacia la zona de SI, mientras que este proceso es restaurado con éxito tanto por la proteína INF2 completa como por mutantes de INF2 relacionadas con la dinámica actina. Para determinar el fragmento mínimo de la formina capaz

de dirigir el movimiento del centrosoma hacia la sinapsis expresamos en, células Jurkat silenciadas para INF2, distintos fragmentos de INF2 y examinamos la reorientación del centrosoma. Solamente los fragmentos que contenían el dominio FH2 fueron capaces de restaurar la reorientación del centrosoma en esas condiciones (Fig. 4.27). Este resultado fue corroborado mediante la expresión del dominio FH2 aislado. El mismo resultado se obtuvo mediante la expresión de un dominio FH2 de INF2 con mutaciones equivalentes a las mutaciones K853A y I704A que inhiben la actividad polimerizadora de actina de mDia2 (Bartolini, F. *et al.*, 2008).

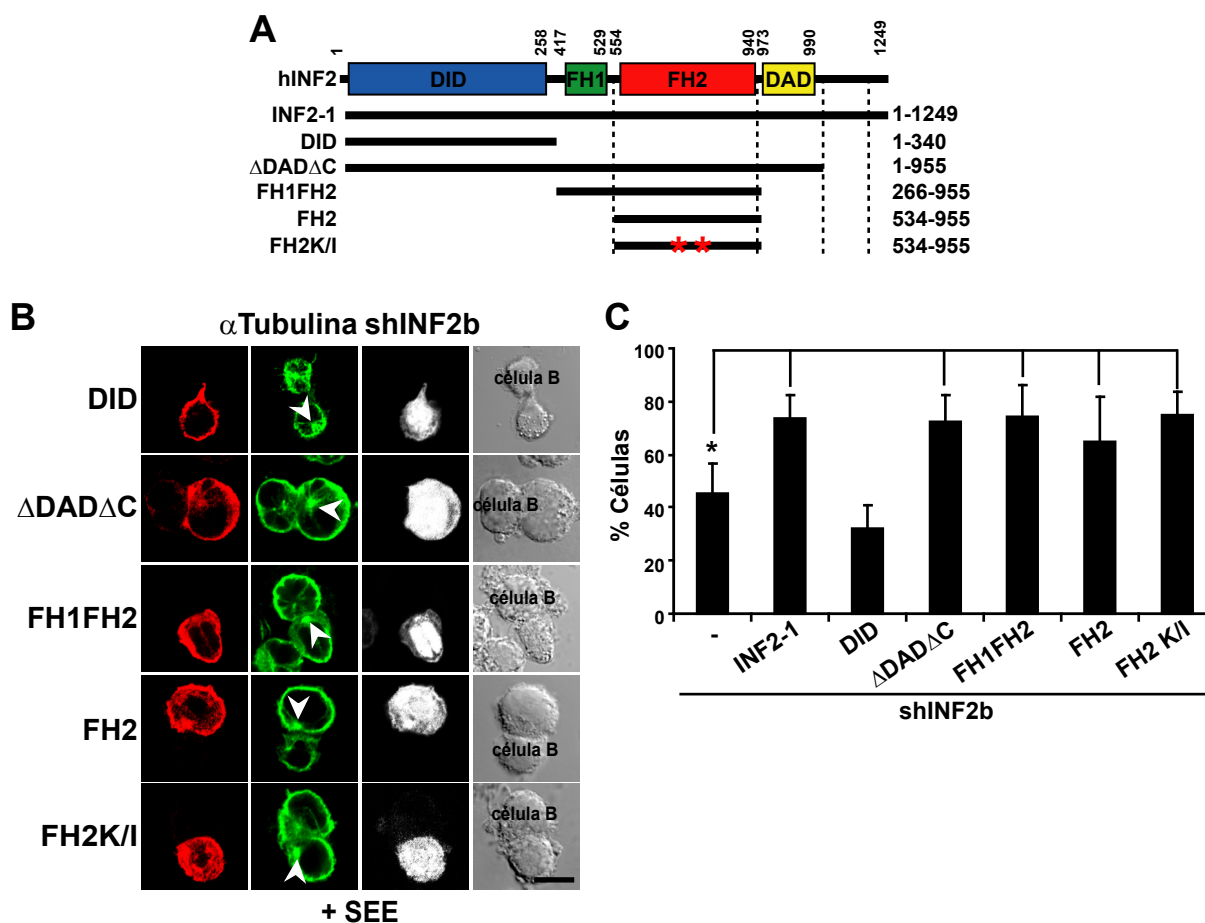


Figura 4.27. El fragmento FH2 de INF2 es suficiente para reorientar el centrosoma. (A) Esquema que muestra las construcciones utilizadas. Los asteriscos indican los lugares de las mutaciones críticas dentro del FH2 (B) En células Jurkat silenciadas para INF2 por la expresión de shINF2b, se expresaron exógenamente los fragmentos indicados de INF2. Las células fueron conjugadas en presencia de SEE y tras su fijación fueron analizadas para la expresión de las proteínas INF2 exógenas y para α -tubulina. Las flechas indican la posición del centrosoma de la célula T. (C) El histograma muestra el porcentaje medio \pm SEM de células T con el centrosoma (MTOC) reorientado a la SI. Se llevaron a cabo tres experimentos independientes y se analizaron 50 células por experimento (*, $p < 0,05$). La barra de tamaño indica 5 μ m.

11. La SI desencadena la estabilización de microtúbulos e INF2 es necesaria para este proceso

En fibroblastos, el centrosoma se reorienta hacia la dirección de migración y se observa en paralelo un aumento en la estabilización de los microtúbulos que parten del centrosoma y se

dirigen al frente de avance (Palazzo, A.F. *et al.*, 2001a; Palazzo, A.F. *et al.*, 2001b; Gomes, E.R. *et al.*, 2005). Como la proteína INF2 es necesaria para la reorientación del centrosoma hacia la SI, pasamos a investigar si en linfocitos T se produce también la estabilización de microtúbulos durante la polarización del centrosoma y el papel de INF2 en ese proceso. Para esto disponíamos de varios anticuerpos que detectaban microtúbulos con distintas modificaciones posttraduccionales. Así, los microtúbulos dinámicos (Tyr-MT) se detectan con el anticuerpo anti-tubulina tirosinada y los microtúbulos estables con anticuerpo anti-tubulina acetilada o anti-tubulina detirosinada según se trate de microtúbulos acetilados (Acet-MT) o detirosinados (Glu-MT). Para examinar el contenido de las células T en los distintos tipos de microtúbulos, se conjugaron las células Jurkat con células Raji en presencia o ausencia de SEE. Mientras que sin SEE la mayoría de las células Jurkat presentaban solamente Tyr-MT y Acet-MT, la estimulación con SEE desencadenó la generación de Glu-MT estables (Fig. 4.28 A,B). Por supuesto, el centrosoma solo se polarizó a la SI en presencia de SEE. Para estudiar la disposición de los Glu-MT en las células T activadas, se realizaron reconstrucciones tridimensionales a partir de apilamientos de 35-40 cortes con una distancia de 0,2 μm entre los cortes. Se escogió para ello una célula Jurkat conjugada en presencia de SEE (Fig. 4.28 C), donde es posible distinguir Glu-MT individuales que parten del centrosoma.

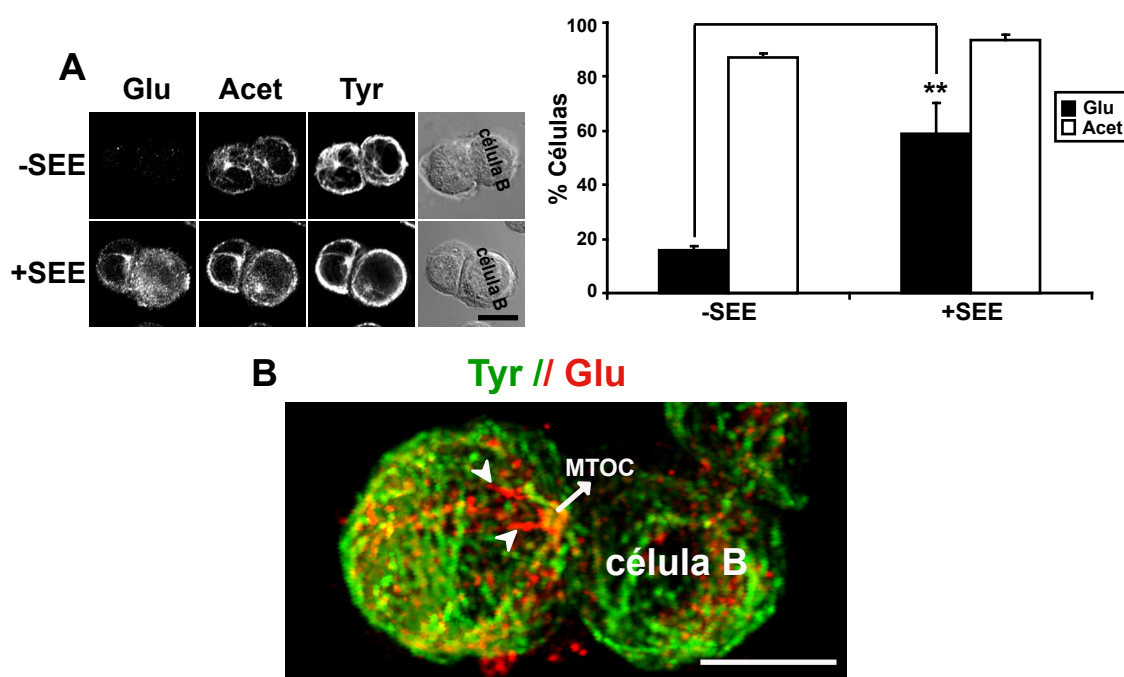


Figura 4.28. La activación de la célula T desencadena la formación de Glu-MT. (A) Células Jurkat conjugadas en presencia (+) o ausencia (-) de SEE, se fijaron con formalina y permeabilizaron con metanol durante 5 minutos. Después se tiñeron para Glu-MT, Acet-MT y Tyr-MT. La barra de tamaño indica 5 μm . El histograma muestra el porcentaje medio \pm SEM de células T con Glu-MT o Acet-MT. Se llevaron a cabo tres experimentos independientes y se analizaron 50 células por experimento (**, $p < 0,01$). (B) Reconstrucción tridimensional de la distribución de Tyr-MT y Glu-MT en células Jurkat conjugadas en presencia de SEE. Las células fueron teñidas para Glu-MT y Tyr-MT. La flecha indica la posición del centrosoma (MTOC) de la célula T. Las cabezas de flecha señalan microtúbulos teñidos para Glu-MT. La barra de tamaño indica 5 μm .

Para estudiar la posible implicación de INF2 en la formación de los Glu-MT se silenció la expresión de INF2 con shINF2a e shINF2b y se examinó el contenido de Glu-tubulina por inmunotransferencia (Fig. 4.29 A). Se observó que los niveles de Glu-tubulina se reducían considerablemente al silenciar INF2 mientras que los niveles de Tyr-tubulina no se veían afectados. Cuando se analizaron por microscopía de fluorescencia los conjugados formados en presencia de SEE, se corroboró que la formación de Glu-MT estaba inhibida en las células silenciadas para INF2. Ni los Tyr-MT ni los Acet-MT resultaron alterados (Fig. 4.29 B,C).

Para comprobar que el efecto se debe al silenciamiento de INF2 e investigar si, como ocurre con la reorientación del centrosoma, el dominio FH2 de INF2 es el implicado en este proceso se expresó de manera exógena la molécula INF2 intacta o su dominio FH2 aislado en células silenciadas para la proteína INF2 endógena. En ambos casos se consiguió restaurar la formación de Glu-MT promovida por la conjugación en presencia de SEE (Fig. 4.30). Más aún, el mismo efecto se consiguió por la expresión del mutante FH2K/I que tiene mutados dos residuos críticos para la polimerización de actina en la formina mDia2 (Bartolini, F. *et al.*, 2008).

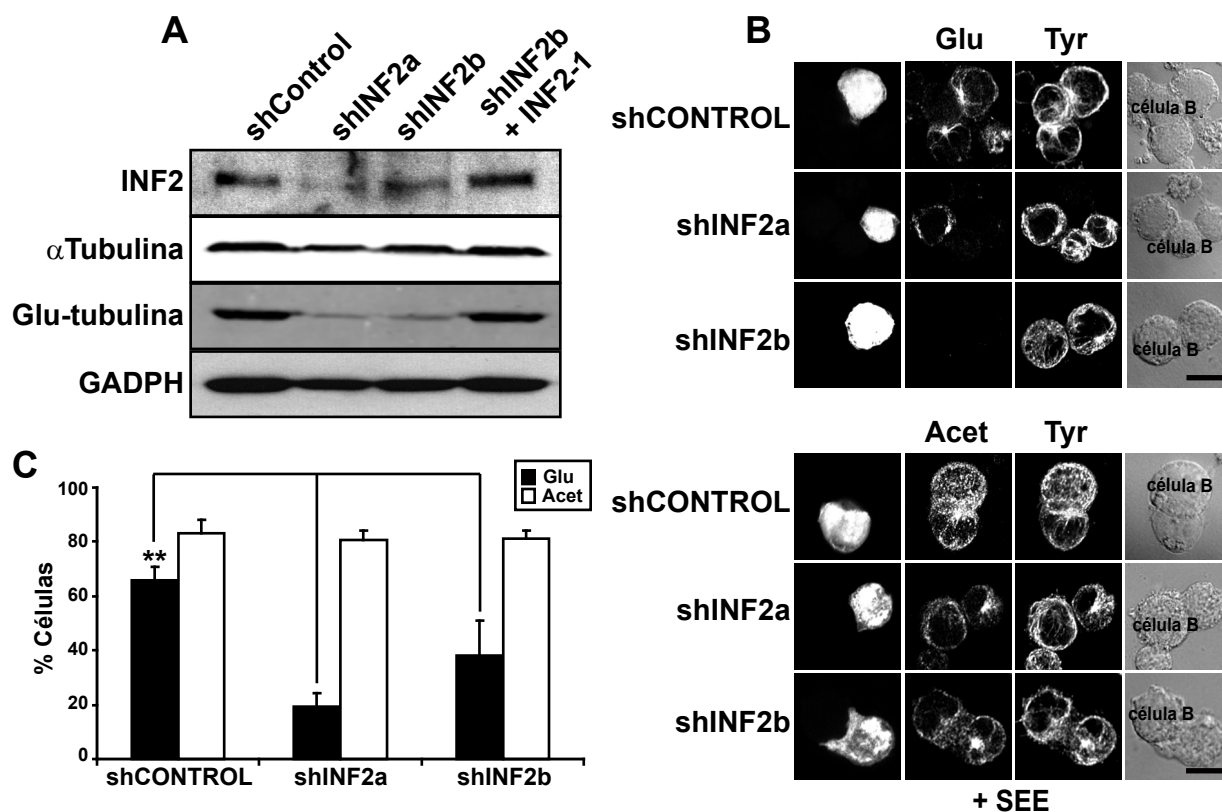


Figura 4.29. La formina INF2 es necesaria para la generación de Glu-MT. (A) Lisados de células Jurkat transfectadas con shControl, shINF2a o shINF2b, o cotransfectadas con shINF2b e INF2-1, se analizaron por inmunotransferencia para detectar INF2, α -tubulina, Glu-tubulina y GAPDH como control. (B) Células Jurkat silenciadas o no para INF2 se sometieron a conjugación en presencia de SEE, se fijaron con formalina y permeabilizaron con metanol durante 5 minutos. Después fueron teñidas para detectar Glu-MT y Tyr-MT (panel superior) o Acet-MT y Tyr-MT (panel inferior). (C) El histograma muestra el porcentaje medio \pm SEM de células T con Glu-MT o Acet-MT. Se llevaron a cabo tres experimentos independientes y se analizaron 50 células por experimento (**, $p < 0,01$). La barra de tamaño indica 5 μ m.

Es de resaltar que, al igual que en las células control, la expresión exógena de la proteína INF2 intacta en células Jurkat en estado estacionario silenciadas para INF2 no presentan Glu-MT mientras que la expresión de fragmentos que incluyen el FH2 de INF2 contienen Glu-MT incluso sin ser activadas (datos no mostrados). Estos resultados sugieren que el dominio FH2 es suficiente para formar Glu-MT.

Como conclusión, la activación con SEE induce en las células T conjugadas la inducción de la formación de Glu-MT siendo requerida INF2 para que este proceso tenga lugar. El dominio FH2 aislado es capaz de inducir la formación de Glu-MT independientemente de su actividad polimerizadora de actina.

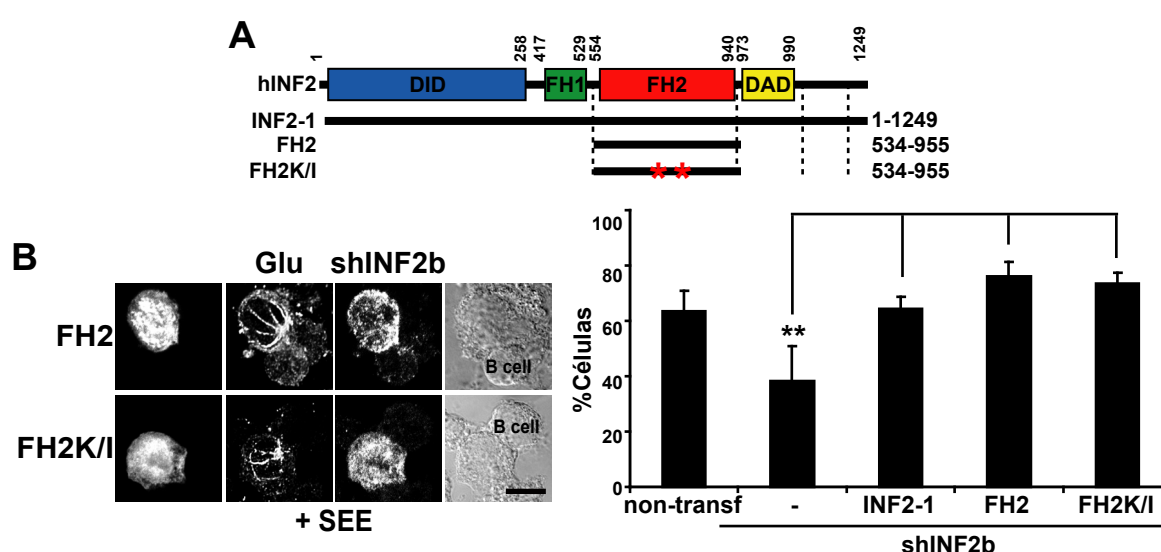


Figura 4.30. El fragmento FH2 de INF2 es suficiente para generar Glu-MT. (A) Esquema con las construcciones utilizadas. Los asteriscos indican los lugares de las mutaciones críticas dentro del FH2. (B) Células Jurkat silenciadas para INF2 con shINF2b se cotransfectaron con INF2-1, FH2 o FH2K/I y se conjugaron con células Raji en presencia de SEE. Tras su fijación y permeabilización, las células se tiñeron para INF2 exógeno y Glu-MT. El histograma muestra el porcentaje medio \pm SEM de células T en conjugados con Glu-MT. Se realizaron tres experimentos independientes y se analizaron 50 células por experimento (**, $p < 0,01$). La barra de tamaño indica 5 μ m.

12. INF2 se une directamente a microtúbulos

Teniendo en cuenta la importancia de INF2 en la generación de Glu-MT y el solapamiento parcial de INF2 con la red microtubular (Fig. 4.2) examinamos si INF2 interacciona directamente con los microtúbulos. Como primera aproximación se sedimentaron los microtúbulos de un lisado de células Jurkat y se encontró a INF2 asociado a la fracción microtubular (Fig. 4.31 B). Este resultado no nos proporcionaba información de si la unión era directa o indirecta o si INF2 sedimentaba por otras causas. Para resolver esta incógnita se llevó a cabo un ensayo de unión directa a microtúbulos ensamblados *in vitro*, aportando este experimento una evidencia más de la unión de INF2 a los microtúbulos (Fig. 4.31 C). El mapeo con distintos fragmentos de INF2 indicó que la unión se realiza por un dominio en el fragmento FH2DAD, de forma similar a como lo hace

mDia2 (Bartolini, F. *et al.*, 2008).

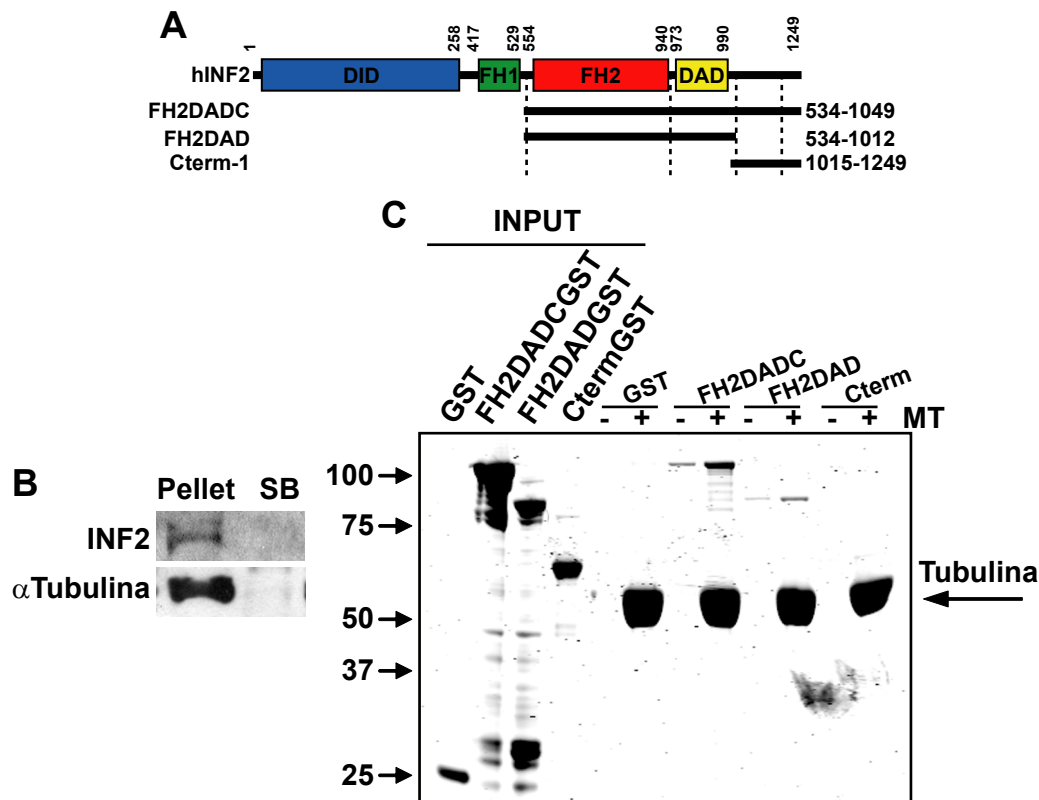


Figura 4.31. INF2 se une directamente a microtúbulos. (A) Esquema con las construcciones utilizadas. (B) Experimento de sedimentación de microtúbulos de lisados de células Jurkat. Las dos fracciones obtenidas, pellet y sobrenadante (SB), se analizaron por inmunotransferencia con anticuerpos frente a INF2 o α -tubulina. (C) Ensayo de unión directa a MT. Los fragmentos indicados de INF2 fusionados a GST se incubaron en presencia (+) o ausencia (-) de microtúbulos (MT). La mezcla se sometió a sedimentación y el pellet se fraccionó por electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS. El gel fue teñido con azul de coomassie. En la parte izquierda del gel se analizó el 5% de la cantidad de proteína fusionadas a GST utilizadas en el ensayo.

Para investigar si INF2 protegía a los microtúbulos de la despolimerización, se llevó a cabo un ensayo *in vitro* de resistencia de los microtúbulos a la despolimerización por frío (Fig. 4.32). Como puede apreciarse, tanto el fragmento FH2DADC de INF2 como el de Dia1, utilizado como control positivo, protegieron a los microtúbulos de la despolimerización, resultado que es consistente con su papel en la estabilización de los mismos.

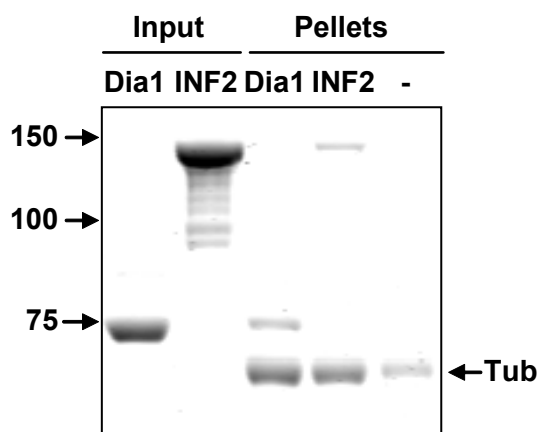


Figura 4.32. INF2 estabiliza microtúbulos frente a la despolimerización por frío. Los fragmentos FH2DADC-GST de Dia1 o INF2 se añadieron o no a los microtúbulos ensamblados in vitro y la mezcla se incubó a 4°C durante 5 min antes de ser sometida a sedimentación. Se señala la presencia de tubulina en el sedimento (Tub). En la parte izquierda del gel se cargó el 10% de las proteínas GST (input) utilizadas. El gel fue teñido con azul de coomassie.

13. Cdc42 y Rac1 son necesarias para la reorientación del centrosoma hacia la SI y para la generación de microtúbulos estables

La regulación de la polarización del centrosoma mediada por el TCR durante la formación de la SI implica a un gran número de moléculas entre las que se encuentran Lck, Fyn, ZAP70, LAT, Vav1 y el complejo dineína-dinactina, (Kuhne, M.R. *et al.*, 2003; Martin-Cofreces, N.B. *et al.*, 2006). Estas proteínas actúan en varias rutas de señalización iniciadas por el TCR, que conducen a la activación de proteínas de la familia de las RhoGTPasas. Hemos visto anteriormente que INF2 interacciona con Rac1 y Cdc42 (Fig. 4.15). Para investigar el papel de RhoA, Rac1 y Cdc42 en la reorientación del centrosoma y en la formación de Glu-MT utilizamos la expresión de shARN específicas para cada una de ellas (Fig. 4.16 A). Como control usamos shRNA específico para las forminas Dia1 y FMNL1 que han sido identificadas previamente como necesarias para la reorientación del centrosoma a la SI (Gomez, T.S. *et al.*, 2007). Rac1 y Cdc42, pero no RhoA, por un lado, y Dia1 y FMNL1 por el lado de las forminas, fueron requeridas para que el centrosoma se reoriente (Fig. 4.33) y la formación de Glu-MT se induzca con normalidad (Fig. 4.34). Esto puede ser interpretado en el sentido de que varias rutas de señalización actúan de forma independiente o que, alternativamente, existan varias rutas que converjan en algún punto para que ambos procesos tengan lugar. Además, junto con los resultados obtenidos en células conjugadas sin SEE y los logrados mediante el silenciamiento de INF2, estos resultados establecen una correlación estrecha entre formación de Glu-MT y la reorientación del centrosoma a la SI. 14. INF2, Rac1 y Cdc42 son necesarias para la reorientación del centrosoma también en linfocitos T primarios

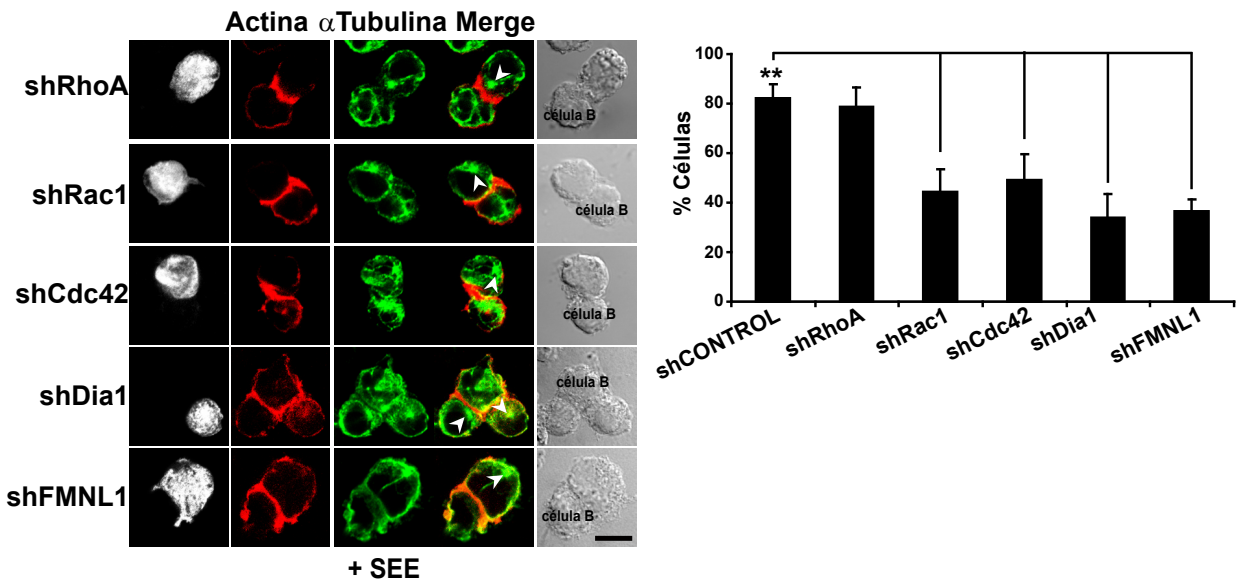


Figura 4.33. Cdc42 y Rac1 son necesarias para la reorientación del centrosoma. Células Jurkat que co-expresaban la proteína GFP y shARN contra RhoA, Rac1, Cdc42, Dia1 o FMNL1 se conjugaron en presencia de SEE. Después de 15 min, las células se fijaron, se permeabilizaron, y se tiñeron para α -tubulina y F-actina. Las flechas indican la posición del centrosoma de la célula T. El histograma muestra el porcentaje medio \pm SEM de células T con el centrosoma reorientado a SI. 50 células por experimento. Se llevaron a cabo tres experimentos independientes y se analizaron 50 células por experimento (**, $p < 0,01$). La barra de tamaño indica 5 μ m.

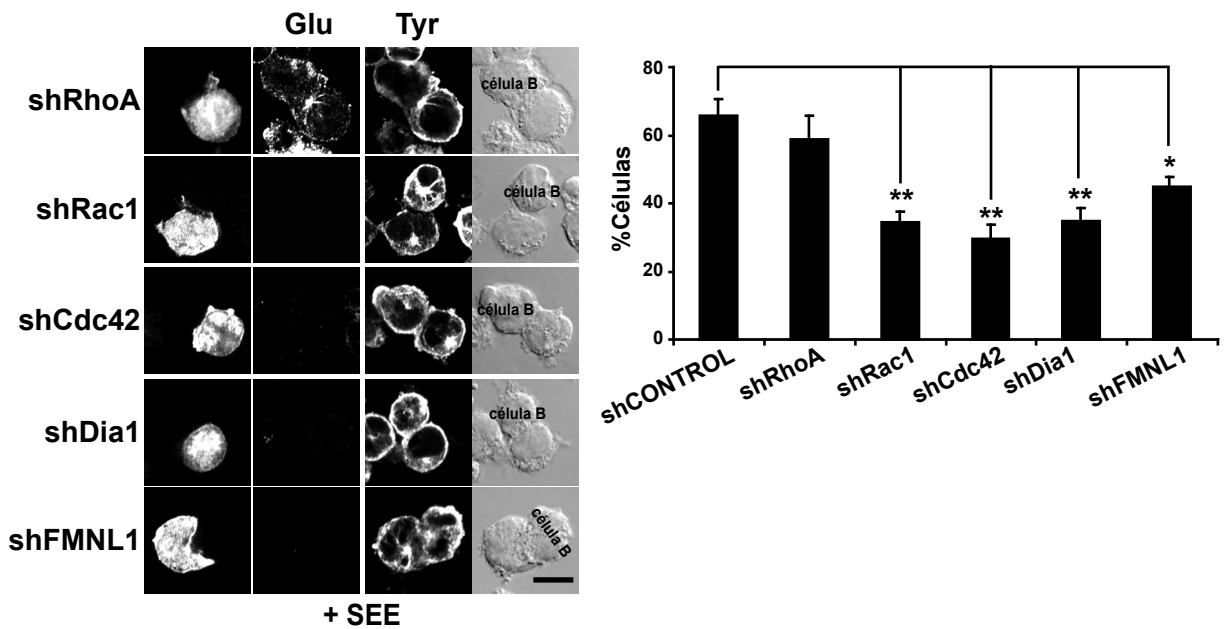


Figura 4.34. Cdc42 y Rac1 son necesarias para la generación de Glu-MT en la SI. Células Jurkat que co-expresaban las proteínas GFP y el shARN contra RhoA, Rac1, Cdc42, mDia1 o FMNL1 se conjugaron en presencia de SEE. Tras su fijación y permeabilización, los conjugados se tiñeron para Glu-MT y Tyr-MT. El histograma muestra el porcentaje medio \pm SEM de células T con Glu-MT. Se llevaron a cabo tres experimentos independientes y se analizaron 50 células por experimento (**, $p < 0,01$). La barra de tamaño indica 5 μ m.

14. INF2, Rac1 y Cdc42 son necesarias para la reorientación del centrosoma y la generación de microtúbulos estables también en linfocitos T primarios

Para investigar si el requerimiento de INF2, Rac1 y Cdc42 en los procesos de reorientación del centrosoma y en la formación de Glu-MT observado en células Jurkat puede ser extendido a linfocitos T normales, se utilizaron linfocitos de sangre periférica aislados de un donante sano. La expresión de INF2, Cdc42 y Rac1 fue silenciada mediante la transfección de shARN específicos y las células se conjugaron con células Raji en presencia de SEE. El centrosoma no se reorientó a la SI en ninguno de los casos (Fig. 4.35 A,C), ni se detectó la formación de Glu-MT en los conjugados formados (Fig. 4.35 B,C).

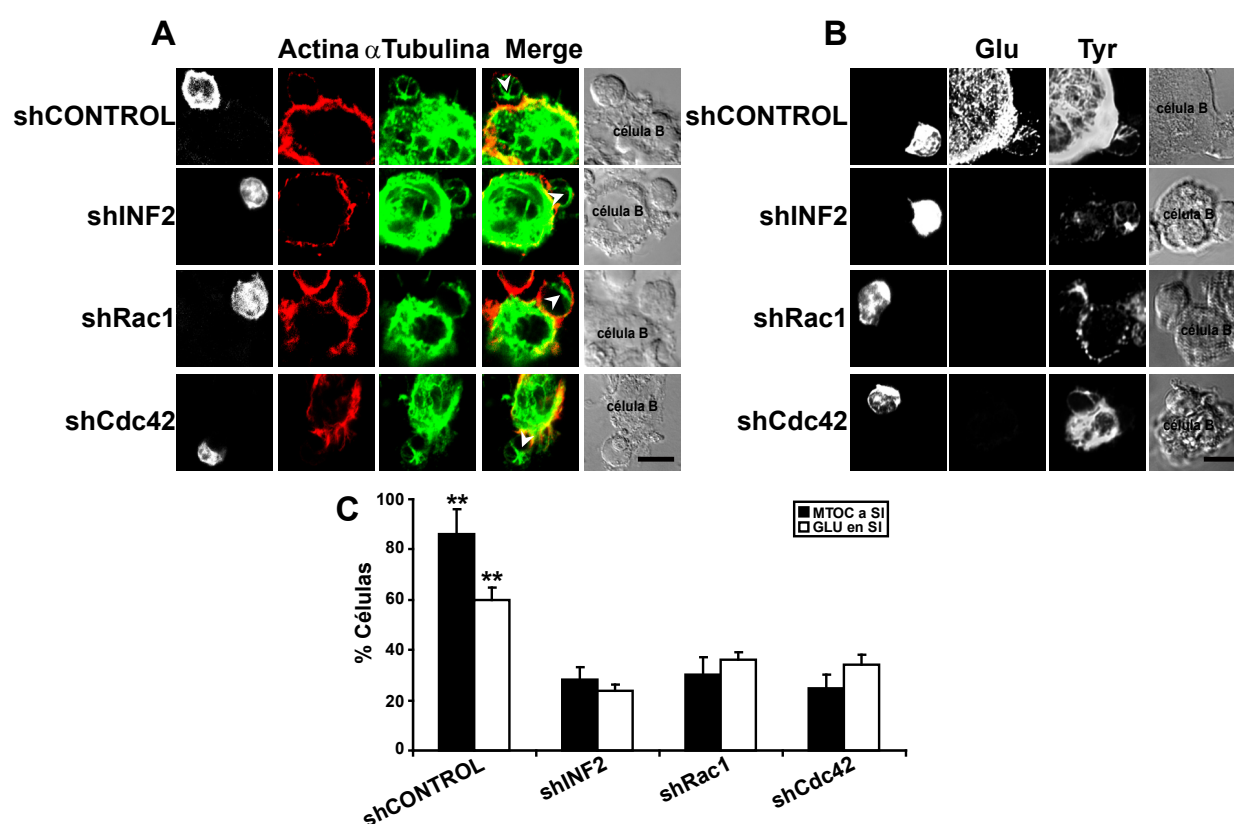


Figura 4.35. INF2, Cdc42 y Rac1 son necesarias para la formación de Glu-MT en linfocitos T. (A, B) Linfocitos de sangre periférica que expresaban GFP y un shARN control o shARN contra INF2, Rac1, Cdc42 se conjugaron con células Raji en presencia de SEE. Tras la fijación y permeabilización, los conjugados fueron teñidos para α -tubulina y F-actina (A) o para Glu-MT y Tyr-MT (B). La barra de tamaño indica 5 μ m. (C) El histograma muestra el porcentaje medio \pm SEM de linfocitos T con el centrosoma reorientado hacia SI (barras negras), o con Glu-MT (barras blancas). Se llevaron a cabo tres experimentos independientes y se analizaron 50 células por experimento (**, $p < 0,01$).

Estos resultados indican que INF2, Rac1 y Cdc42 son necesarias para los procesos de reorientación del centrosoma y de generación de Glu-MT durante la formación de la SI en linfocitos T primarios, validándose así los resultados obtenidos en células Jurkat.

5.-DISCUSIÓN

1. INF2 no es una formina invertida

La formina INF2 se incluyó inicialmente junto con la formina INF1 dentro del subgrupo de las forminas invertidas porque la secuencia de INF2 existente en aquel momento en las bases de datos estaba incompleta y situaba al dominio FH2 en una región de la proteína considerada erróneamente como extremo amino terminal. Estudios posteriores de nuestro laboratorio (Madrid, R. *et al.*, 2010) y de otro laboratorio (Chhabra, E.S. y Higgs, H.N., 2006) demostraron que, como otras forminas, la proteína INF2 posee, una extensión amino terminal con un dominio DID. Por lo tanto, la estructura de INF2 es en realidad más similar a las forminas de la subclase de las Drf como mDia1 que se regulan por autoinhibición que a la formina invertida INF1 (Fig. 5.1). Además, el análisis bioinformático de la secuencia de todas las forminas, sitúan a INF2 más cerca de la subclase de las Drf que del resto de las forminas (Young, K.G. *et al.*, 2008).

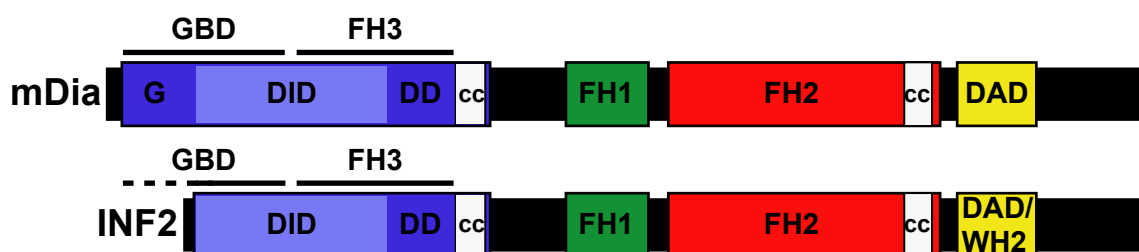


Figura 5.1. Esquema de la organización en dominios de mDia y de INF2.

INF2 posee la característica, hasta la fecha no descrita para otras forminas, de que además de nuclear la polimerización de actina como todas las forminas es capaz, además, de cortar y despolimerizar filamentos de actina al menos en ensayos *in vitro* (Chhabra, E.S. y Higgs, H.N., 2006). Para la actividad despolimerizadora de INF2 se requiere el dominio DAD que en INF2 tiene similitud con el dominio WH2 descrito inicialmente en la familia WASP de proteínas, que es capaz de interactuar con actina monomérica (G-actina). Los tres residuos de leucina cruciales para la función de los dominios WH2 están conservados en INF2 pero no en las forminas mDia1 y mDia2, que carecen de actividad despolimerizadora de actina (Fig. 5.2). Es muy posible, que esta característica de INF2 determine diferencias funcionales importantes con respecto de otras forminas. La existencia de ambas actividades en la molécula de INF2 llevaron a proponer que a diferencia de otras forminas que forman filamentos largos de actina, INF2 formaría filamentos cortos, también llamados cometas de actina (Chhabra, E.S. y Higgs, H.N., 2006).

		★★★	★	
WASP	449	RGALLDQIRQGIQLN	463	
hINF2	967	IDALLADIRKGFQLR	987	
mDia1	1175	MDSLLEALQSGAAFR	1295	
mDia2	1035	MDSLLEALQSGAAFR	1055	

Figura 5.2. Alineamiento de las secuencias del DAD de INF2, mDia1 y mDia2 con el dominio WH2 de WASP. Los tres residuos de leucina importantes (asteriscos) para la unión de G-actina del dominio WH2 de WASP están presentes en INF2 pero no en mDia1 o mDia2.

Las RhoGTPasas ciclan entre su forma unida a GTP, activa, y la unida a GDP, inactiva. La carga GTP de estas proteínas modula el plegamiento de las regiones interruptoras I y II (switches I y II) que están implicadas en la interacción con los efectores (Fig. 5.3A). La unión de GTP mantiene a estas dos regiones interaccionando con el grupo γ -fosfato del GTP, exponiéndolas de forma que puedan asociarse con posibles efectores. La hidrólisis del GTP conduce a una conformación más relajada de la GTPasa de forma que la secuencias de dichas regiones interruptoras son inaccesibles a sus moléculas efectoras (Vetter, I.R. y Wittinghofer, A., 2001).

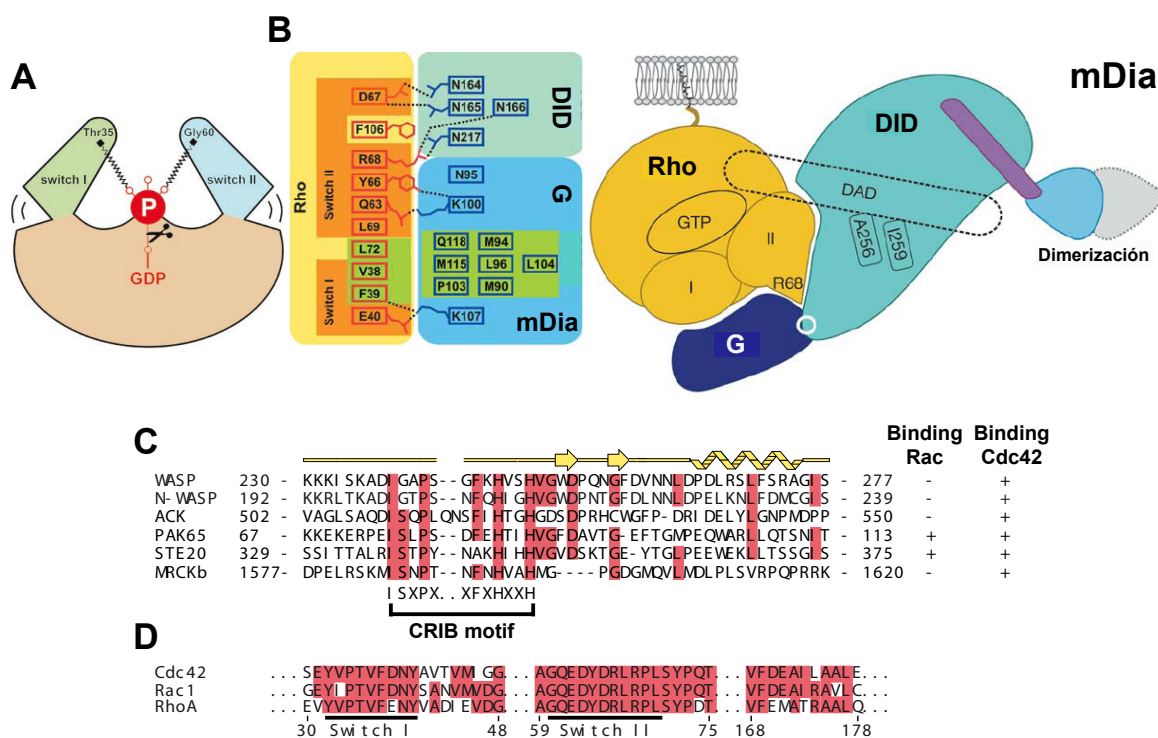


Figura 5.3. Unión de las forminas a RhoGTPasas. (A) Diagrama que muestra el mecanismo por el que los interruptores I y II de las RhoGTPasas se unen al γ -fosfato del GTP unido. La hidrólisis del GTP elimina el grupo fosfato y las regiones interruptor I y II adquieren una conformación más relajada. (B) Esquema de los residuos de RhoC y mDial1 que interactúan cuando están unidos (izquierda). Esquema del modelo propuesto para la unión de RhoC-mDial1 basado en estudios cristalográficos (derecha). (C) Alineamiento de las proteínas con dominios CRIB. El dominio CRIB consenso está subrayado. (D) Alineamiento de las secuencias de Cdc42, Rac y Rho humanas. Los dominios interruptor I y II están subrayados. Imágenes modificadas de (Abdul-Manan, N. et al., 1999; Vetter, I.R. y Wittinghofer, A., 2001; Rose, R. et al., 2005).

La proteínas Rac y Cdc42 poseen una similitud elevada (~70%) en su secuencia de aminoácidos mientras que la de Rac o Cdc42 con RhoA es mucho más baja (~45%). Por este motivo Rac y Cdc42, pero no Rho, comparten la mayoría de sus efectores y se unen a ellos de forma diferente a como lo hace RhoA. Por ejemplo, el dominio de unión a la GTPasa (GBD) de mDia1 está formado por dos regiones, la región G y una serie de repeticiones de tipo armadillo situada en el extremo amino terminal de su dominio DID (Fig. 5.1). La secuencia interruptor I de RhoC contacta mayoritariamente con la región G, mientras que la secuencia interruptor II lo hace con el DID (Fig. 5.3 B) (Rose, R. *et al.*, 2005). En el caso de los efectores de Rac y de

Cdc42, como es el caso por ejemplo de WASP, existe un dominio denominado CRIB (Cdc42/Rac interactive binding) (Fig. 5.3 C) que se une casi en exclusiva a la secuencia interruptor I de estas dos GTPasas (Abdul-Manan, N. *et al.*, 1999). Las secuencias interruptor I de Rac1 y de Cdc42 son prácticamente idénticas, mientras que las correspondientes al interruptor II son iguales entre Rac1 y Cdc42 como cabe esperar dada su interacción con dominios CRIB, y difieren en un aminoácido de la región interruptor II de RhoA (Fig. 5.3 D).

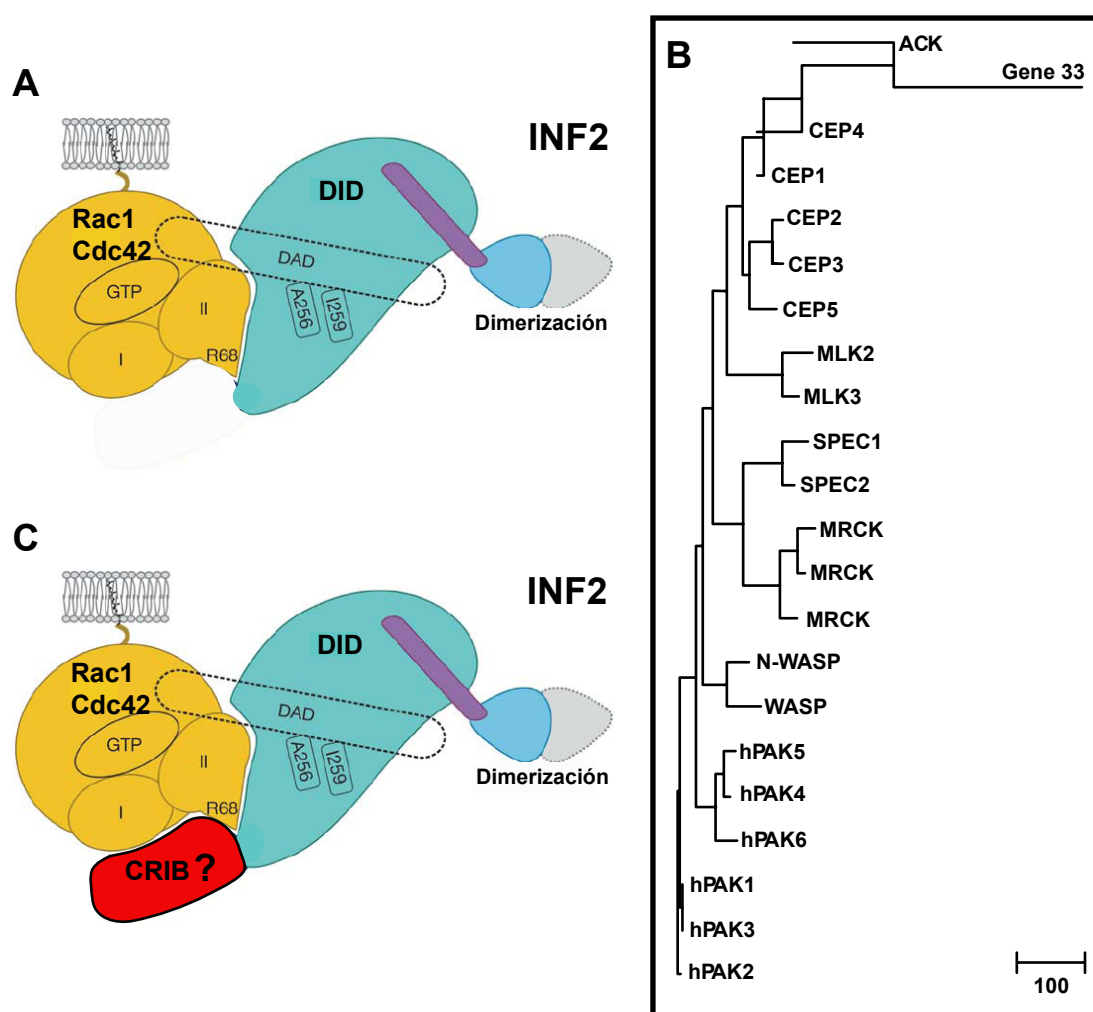


Figura 5.4. Unión de las INF2 a Rac1/Cdc42. (A) Modelo de la unión de Rac1 o de Cdc42 a INF2. (B) Filograma de las proteínas humanas que contienen dominios CRIB. La barra de escala indica cien sustituciones cada cien residuos. (C) Modelo de la unión de Rac1 o de Cdc42 a INF2 junto con una proteína con dominio CRIB. Imágenes modificadas de Pirone, D.M. *et al.*, 2000 y de Rose, R. *et al.*, 2005.

La formina INF2 no posee una región G adyacente a su dominio DID, ya que dicho dominio constituye prácticamente su extremo amino terminal (Fig. 5.1), ni una secuencia CRIB que pueda unirse a Rac1 o Cdc42. Pese a ello, los experimentos de “pull-down” con el dominio DID indicaron que INF2 es capaz de unirse específicamente a Rac1 y a Cdc42, pero no a RhoA. Aunque es posible que existan otras interacciones de Rac1/Cdc42 con otras secuencias del DID de INF2, dada la ausencia de región G y de secuencia CRIB en INF2 proponemos que Rac1 y Cdc42 se unan a INF2 principalmente a través de la interacción de las secuencias armadillo del DID con

la región interruptor II de estas dos GTPasas. De esta forma quedaría libre la región interruptor I de Rac1 o Cdc42 para la unión de posibles efectores portadores de secuencias CRIB (Fig. 5.4 A). En humanos, existen 25 genes que codifican proteínas con dominio CRIB completo (Fig. 5.4 B). Además, los genes *Par-6A*, *B* y *C* codifican por proteínas con la mitad de la secuencia CRIB que, en colaboración con otra zona de la misma molécula, pueden unirse también a Cdc42 (Pirone, D.M. *et al.*, 2000). Es posible que alguna de estas proteínas pueda unirse a la región interruptor I libre de Rac1 o Cdc42 y colabore con INF2 para llevar a cabo su función (Fig. 5.4 C).

3. INF2 regula la formación de las vesículas MAL[±]

La interacción de MAL con INF2 ocurre por el dominio carboxilo terminal de INF2 que no se encuentra conservado en otras forminas. A través de esta misma región, INF2 es capaz de unirse también a MAL2 (Madrid, R. *et al.*, 2010). Se desconoce la región de MAL o MAL2 implicada en la unión aunque es de suponer que se trate de alguna secuencia especialmente conservada en las dos proteínas.

En células Jurkat, la formina INF2 se localiza en la región subcortical colocalizando con actina, solapando con los microtúbulos radiales y en una acumulación pericentriolar. Mediante videomicroscopía hemos observado que las vesículas transportadoras MAL[±] se mueven a lo largo de los microtúbulos, que son utilizados como carriles para llegar a la membrana plasmática. Es posible que este uso de los microtúbulos como carriles sea debido a la interacción observada de INF2 con los microtúbulos. Así, INF2 podría unir directamente a la vesícula MAL[±] con el microtúbulo, y ya sobre el microtúbulo, la vesícula podría moverse mediante la interacción con alguna proteína motora del tipo kinesina, que transporta vesículas desde el centrosoma hacia la membrana plasmática.

El ensamblaje de filamentos de actina puede promover el movimiento de vesículas y de incluso patógenos intracelulares (Ploubidou, A. y Way, M., 2001; Taunton, J., 2001). La polimerización *in vitro* de filamentos de actina tan cortos como 0,7 μ m entre una formina inmovilizada y un segundo punto de anclaje puede producir fuerzas de ~ 1 pN que serían suficientes para propulsar el movimiento vesicular (Kovar, D.R. y Pollard, T.D., 2004; Kozlov, M.M. y Bershadsky, A.D., 2004). Por lo tanto, una posibilidad alternativa a la participación de proteínas motoras es que INF2, gracias a sus actividades polimerizadora y despolimerizadora de actina sea capaz de generar cometas de actina que propulsen el movimiento vesicular. Es interesante resaltar que INF2 necesita ambas actividades para llevar a cabo su función en el transporte de las vesículas MAL[±] y que este transporte requiere que se mantenga la dinámica de actina, como pudo observarse mediante el tratamiento con inhibidores. En el caso de las células hepáticas HepG2, se pudo detectar la existencia de cometas de actina asociados a las vesículas MAL2[±] que transportaban material a la superficie apical/canalicular. En las células silenciadas para INF2, los cometas de actina desaparecían y el transporte apical resultaba bloqueado (Madrid, R. *et al.*, 2010). Debido a su pequeño citoplasma, no ha resultado posible visualizar cometas de actina en

las células Jurkat pero pensamos que es muy probable que estos filamentos cortos de actina sean los que propulsen el movimiento de las vesículas MAL⁺. En este sentido, es interesante el hecho de que una forma constitutivamente activa de INF2, Δ ID1AC alinea los filamentos de actina con los microtúbulos, lo que sugeriría que la formina INF2 podría actuar como proteína de unión entre ambos citoesqueletos, como ya está descrito para otras forminas (Ishizaki, T. *et al.*, 2001). Por lo tanto, INF2 podría por un lado asociar las vesículas a los microtúbulos y por otro propulsar su movimiento a través de la formación de cometas de actina (Fig. 5.5).

En otros tipos celulares las forminas mDia1, mDia2 y mDia3 modulan el tráfico endosomal al regular el ciclo de polimerización de los filamentos de actina (Gasman, S. *et al.*, 2003; Fernandez-Borja, M. *et al.*, 2005; Wallar, B.J. *et al.*, 2007). Estas forminas son capaces de llevar a cabo la nucleación y polimerización de actina en filamentos lineales, pero para generar cometas de actina el requerirían de moléculas accesorias que tengan actividad despolimerizadora o de troceo de los filamentos de actina. INF2, por el contrario, no necesitaría de proteínas accesorias para este proceso ya que la misma molécula presenta las dos actividades (Chhabra, E.S. y Higgs, H.N., 2006).

4. INF2 controla el transporte de Lck a la membrana plasmática

La expresión de Lck en membrana plasmática es esencial para que tenga lugar su función en la señalización en los linfocitos T (Kabouridis, P.S. *et al.*, 1997). Se sabía además que Lck utiliza la ruta exocítica para llegar a la superficie celular (Bijlmakers, M.J. y Marsh, M., 1999). En células Jurkat, Lck colocaliza con la proteína MAL en estructuras endosomales, viaja a la membrana plasmática en las mismas vesículas que contienen MAL, y requiere de la expresión de MAL para ser transportada. Estos resultados llevaron a proponer que MAL es un elemento de la maquinaria para el transporte exocítico de Lck a la membrana plasmática (Anton, O. *et al.*, 2008). Puesto que hemos encontrado que el transporte de las vesículas MAL⁺ a la membrana es totalmente dependiente de la expresión de INF2, es lógico que el transporte de Lck también lo sea como ha sido demostrado por nuestros experimentos en células Jurkat silenciadas para INF2. No hay que olvidar, sin embargo, que parece existir una población de Lck citosólica, no vesicular, y que parte de esta población se encuentra en la proximidad de la membrana plasmática. Esta población de moléculas de Lck podría asociarse/disociarse de la membrana plasmática sin necesidad de transporte vesicular por un mecanismo de palmitoilación/despalmitoilación (Zimmermann, L. *et al.*, 2009). Por lo tanto, la llegada a membrana de Lck a través del tráfico vesicular mediado por INF2 y MAL, coexistiría con otros mecanismos, aparentemente minoritarios, capaces de incorporar Lck a la membrana a través de un mecanismo alternativo.

Un efecto similar sobre la distribución de Lck al observado al silenciar MAL o INF2 ha sido descrito en células Jurkat silenciadas para la proteína Uncoordinated 119 (Unc119) o para Rab11 (Gorska, M.M. *et al.*, 2009). La expresión de la proteína Nef del virus VIH también reduce los niveles de Lck en la membrana plasmática (Haller, C. *et al.*, 2007). Es posible por lo tanto

que estas proteínas (Unc119y Rab11) colaboren con MAL e INF2 en el transporte de Lck a la membrana plasmática, y que la proteína Nef utilice como diana alguna de estas proteínas y la inhiba, y de esta forma bloquee el transporte de Lck.

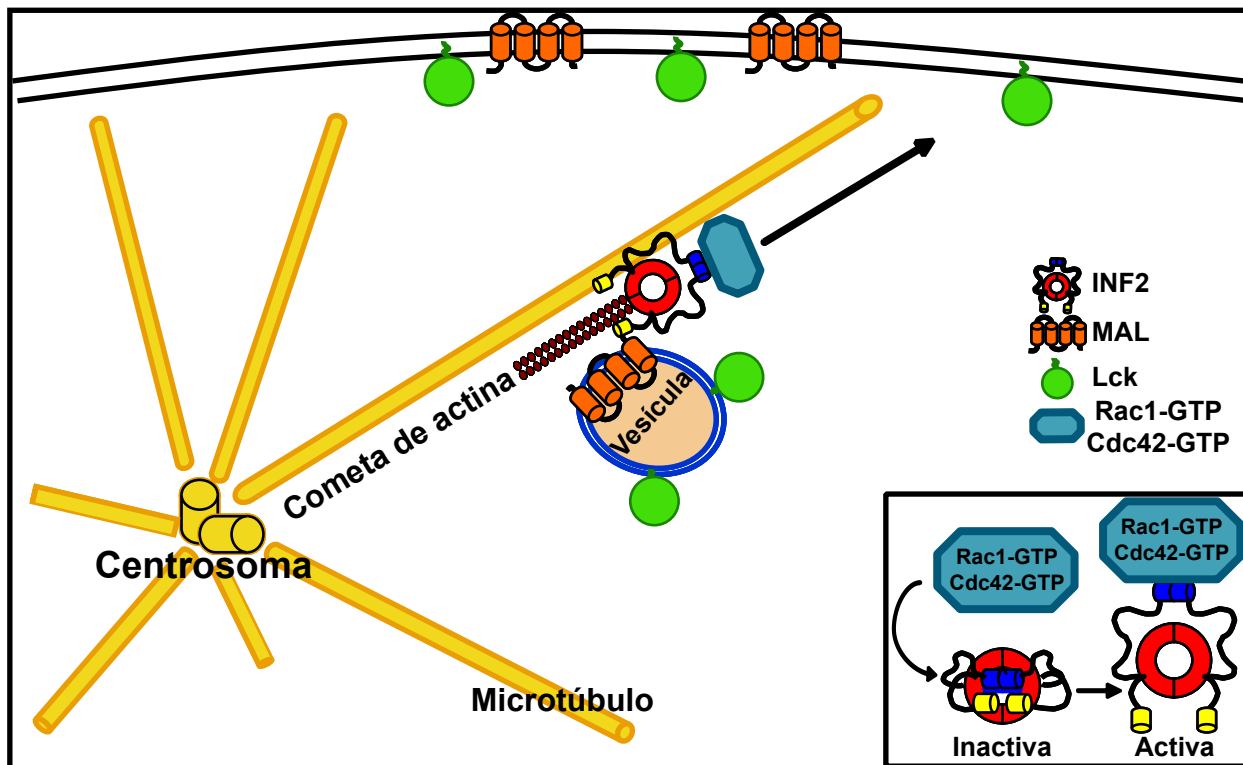


Figura 5.5. Modelo propuesto para el transporte de Lck mediado por INF2 y MAL. La proteína INF2 activa se uniría por su dominio carboxilo terminal (Cterm) a la proteína MAL, que se encuentra asociada a la membrana de las vesículas endosomales que transportan Lck. La forma inactiva de INF2 también se une a los microtúbulos de manera directa. INF2 actuaría como nexo con los microtúbulos y podría propulsar el movimiento de las vesículas mediante la formación de cometas de actina. No se puede descartar la participación de otras proteínas motoras como las kinesinas en el movimiento de las vesículas.

Por último, nuestros resultados indican que Rac1 y Cdc42, que se unen a INF2, también son necesarias para la expresión de Lck en membrana. El doble silenciamiento de ambas GTPasas aumenta ligeramente el porcentaje de células con poca expresión de Lck en membrana con respecto a los silenciamientos individuales. Esto podría deberse a que Rac1 y Cdc42 actúen en momentos distintos de la ruta de transporte. Por otra parte, la expresión de tanto las formas constitutivamente activas como de los dominantes negativos de Rac1 o Cdc42 en células Jurkat provoca la acumulación interna de Lck. Este resultado puede interpretarse en el sentido de que el transporte de Lck requiera el reciclado de las RhoGTPasas Rac1 y Cdc42 entre sus formas activas cargadas con GTP y las inactivas cargadas con GDP, como ha sido propuesto para el movimiento de los endosomas mediado por mDia2 o RhoB (Waller, B.J. *et al.*, 2007). Una posible explicación de esto, es que el ciclo de las GTPasas es importante para promover la dinámica entre las formas activa e inactiva de INF2 y necesaria también para mantener la dinámica de actina. La existencia de esta dinámica en la polimerización y despolimerización de actina hemos visto

que es muy importante para el transporte de Lck tanto con el uso de inhibidores específicos de la dinámica de la actina (lantrunculina A, citocalasina D y jasplakinolide) como con el uso de mutantes en las actividades polimerizadora y despolimerizadora de actina de INF2. Por lo tanto, nuestros resultados son coherentes con la necesidad de una dinámica de actina promovida por INF2 y regulada por Rac1 y Cdc42 para que tenga lugar de forma eficiente el transporte de Lck mediado por las vesículas de MAL (Fig. 5.5).

5. INF2 es necesaria para la reorientación del centrosoma a la sinapsis inmunológica

Los linfocitos T que se encuentran migrando presentan dos zonas bien diferenciadas, un lamelipodio rico en actina en el frente de avance y un urópodo en la parte trasera en el que se encuentran la mayoría de las moléculas de señalización además del centrosoma, que se sitúa por detrás del núcleo que se encuentra en el cuerpo celular. El reconocimiento de un antígeno presentado por una APC en el contexto adecuado inhibe el proceso de migración y produce una reorganización profunda del citoesqueleto y de la membrana plasmática y una redistribución de los orgánulos intracelulares para dar lugar a la formación de la SI (Huppa, J.B. y Davis, M.M., 2003). Diferentes receptores, moléculas señalizadoras y la actina polimerizada se redistribuyen y polarizan rápidamente hacia la zona de contacto formando el SMAC. Otro de los procesos importantes que tienen lugar es la reorientación del centrosoma, que se trasloca a una zona próxima a la SI para quedar situado entre el núcleo y la SI (Billadeau, D.D. *et al.*, 2007). En otros tipos celulares, como fibroblastos, se ha descrito que la reorientación del centrosoma al frente de avance durante la migración ocurre debido al movimiento del núcleo, que se posicionaría detrás del centrosoma, y al mantenimiento del centrosoma en el centroide o centro celular (Palazzo, A.F. *et al.*, 2001b; Gomes, E.R. *et al.*, 2005). Aunque dista mucho todavía de estar esclarecido, el mecanismo en el linfocito T parece ser diferente. Se ha descrito el requerimiento de Fyn, Vav1, ZAP-70, LAT, Lck, HDAC-6, dineína, ADAP, y de las forminas Dia1 y FMNL1 entre otras proteínas necesarias para que se produzca de forma eficiente la polarización del centrosoma a la sinapsis. Aunque se desconoce el papel exacto de estas proteínas en este proceso, en el caso de la dineína se conoce que interacciona con el adaptador ADAP en el pSMAC y que podría generar fuerza de tracción sobre los microtúbulos anclados a la sinapsis que empujarían al centrosoma hacia la SI (Combs, J. *et al.*, 2006).

Los trabajos anteriores de nuestro grupo sugerían que la proteína MAL también es requerida para que el centrosoma se reoriente a la SI (Anton, O. *et al.*, 2008). Puesto que uno de los defectos principales observados en células Jurkat carentes de MAL es una deficiencia en el transporte de Lck a la membrana plasmática, se ensayó si la expresión forzada de Lck en la membrana plasmática restauraba la polarización del centrosoma. Estos experimentos llevaron a concluir que la ausencia de Lck en la membrana plasmática no era la única causa de la falta de reorientación del centrosoma. Por lo tanto, MAL podría estar transportando alguna molécula

necesaria para este proceso o ejerciendo otra alguna función necesaria para que se produzca la polarización del centrosoma. Nuestro estudio indica que MAL interacciona con INF2 y que esta proteína es esencial para la reorientación del centrosoma. Los estudios de mapeo de esta actividad utilizando mutantes de delección de INF2, identificaron al dominio FH2 como suficiente para llevar a cabo el proceso de reorientación del centrosoma en ausencia de la proteína INF2 endógena.

6. La polimerización de actina en la sinapsis inmunológica y la reorientación del centrosoma son dos procesos independientes

Tras el reconocimiento del antígeno presentado por la APC, el linfocito polimeriza gran cantidad de actina que se polariza a la zona de contacto. Las forminas Dia1 y FMNL1, dos de las forminas mayoritarias en linfocitos T, se distribuyen en la membrana plasmática, alrededor del centrosoma y a lo largo de los microtúbulos. En los conjugados, ambas forminas se translocan a la SI y permanecen también en la zona centrosomal. Pese a su localización en la SI y a su actividad nucleadora de actina, estas forminas no son necesarias para la polimerización de actina en la SI sino que este proceso está mediado por el complejo complejo Arp2/3 (Gomez, T.S. *et al.*, 2007). La distribución de INF2 en linfocitos T, tanto en reposo como en conjugados, es similar a la descrita para Dia1 y FMNL1 y, al igual que estas, INF2 no es necesaria para que se produzca la acumulación de actina polimerizada en la SI ya que las células silenciadas para INF2 polimerizan actina en la SI de forma eficiente. Mediante el empleo de inhibidores de la dinámica de actina o el silenciamiento de Arp2/3 se observó que la reorientación del centrosoma no requiere que se produzca la polimerización de actina en la SI (Sedwick, C.E. *et al.*, 1999). Recíprocamente, la actina polimerizada se polariza a la SI en ausencia de reorientación del centrosoma (Anton, O. *et al.*, 2008; Martin-Cofreces, N.B. *et al.*, 2008). La reorientación del centrosoma y la polarización de actina en la SI son, pues, procesos regulados de forma independiente.

7. La activación de los linfocitos T induce la formación de Glu-MT en un proceso dependiente de la expresión de INF2

En fibroblastos, la activación de RhoA con ácido lisofosfatídico (LPA), presente en el suero, induce la formación de microtúbulos estables del tipo Glu-MT (Palazzo, A.F. *et al.*, 2001a). Estos microtúbulos, al contrario que los microtúbulos dinámicos que presentan una vida media de 5-10 minutos, tienen una vida media de varias horas. La detirosinación de la tubulina en su extremo C-terminal no parece ser la causa de la estabilización sino tan sólo una marca de los microtúbulos estables (Palazzo, A. *et al.*, 2003). La formación de Glu-MT no está necesariamente acompañada por la acetilación de los microtúbulos. En resumen, los Glu-MT y los Acet-MT corresponden a dos poblaciones de microtúbulos diferentes. La función de la estabilización de los microtúbulos, es decir, la generación de microtúbulos con una vida media alta, genera debate. Podría ser que las modificaciones posttraduccionales que sufren las tubulinas de los microtúbulos sirvieran de anclaje a proteínas, tales como proteínas motoras, lo que facilitaría el transporte direccionado y

rápido hacia una zona específica de la célula, ya que los microtúbulos estables se suelen generar en zonas activadas (Peris, L. *et al.*, 2009). Durante la migración celular los microtúbulos estables podrían indicar la dirección de movimiento, aunque una tasa de estabilización elevada puede impedir la polarización celular durante la migración, y, por ejemplo, permitir el anclaje a un sustrato. El mantenimiento de la forma celular, en parte debido a los filamentos de actina, también se sustentaría en los microtúbulos estables. Procesos como la formación de una SI, que suceden en tiempos prolongados, necesitan de un armazón menos dinámico que sea capaz de mantenerlo en el tiempo.

Después de descartar que las actividades de INF2 relacionadas con la dinámica de actina no son requeridas para que tenga lugar la reorientación del centrosoma a la SI y puesto que, algunas forminas como mDia1 han sido implicadas también en la formación de microtúbulos estables del tipo Glu-MT, decidimos analizar la presencia de este tipo de microtúbulos en los linfocitos T en reposo o formando una SI. Los linfocitos T en reposo apenas presentaron Glu-MT aunque sí contenían Acet-MT. Es muy importante la observación de que en los conjugados de células Jurkat activados con SEE se indujera de forma específica la formación de Glu-MT. Estos microtúbulos se disponen en forma de haz hacia la SI y podrían estar relacionados con la reorientación de centrosoma y con el transporte polarizado de moléculas a la SI. Los experimentos de silenciamiento, nos permitieron concluir que la formación de estos Glu-MT requiere de la expresión de INF2. Además la expresión individual del dominio FH2 de INF2, que al igual que el de mDia2 (Bartolini, F. *et al.*, 2008), interacciona directamente con tubulina fue suficiente para restaurar la formación de Glu-MT en células silenciadas para la proteína INF2 endógena. El mismo resultado se consiguió mediante la expresión del dominio de FH2 con las mismas mutaciones que inactivan la capacidad polimerizadora de actina de otras forminas como Bnp1 y mDia2.

Como resumen, INF2 parece necesaria para que se produzca la reorientación del centrosoma y la formación de Glu-MT en los conjugados de células Jurkat. Además, su dominio FH2 es capaz de mediar ambos procesos, incluso con mutaciones en residuos críticos para su actividad polimerizadora de actina.

8. Rac1 y Cdc42, pero no RhoA, regulan la reorientación del centrosoma y la formación de Glu-MT mediada por INF2

En fibroblastos, la reorientación del centrosoma al frente avance está regulada por Cdc42, mientras que la formación de Glu-MT está controlada por RhoA a través de su molécula efectora mDia1 (Ishizaki, T. *et al.*, 2001; Palazzo, A.F. *et al.*, 2001a; Wen, Y. *et al.*, 2004). Los estudios sobre las RhoGTPasas implicadas en la reorientación del centrosoma a la SI en los linfocitos T señalaban a Cdc42 como responsable de este proceso, ya que la expresión de un dominante negativo de Cdc42 impide la polarización del centrosoma (Stowers, L. *et al.*, 1995). Sin embargo, otro trabajo más reciente utilizando silenciamiento por la expresión de shARN específicos, han apuntado a Rac1 como la RhoGTPasa involucrada (Gomez, T.S. *et al.*, 2007). Existe controversia por lo tanto sobre

la identidad de las RhoGTPasas que regulan este proceso. Nuestros experimentos de silenciamiento son conciliadores con ambos resultados ya que indican que tanto Rac1 como Cdc42, pero no RhoA, son requeridos para la reorientación del centrosoma. La razón de las diferencias entre todos estos resultados puede ser debida a la aproximación utilizada (dominantes negativos versus silenciamiento), al grado diferente de silenciamiento alcanzado, o a otras condiciones utilizadas en el ensayo que pudieran afectar al resultado.

La formación de Glu-MT en linfocitos T apenas ha sido estudiada aunque existen algunos trabajos sobre la presencia de microtúbulos estables o Acet-MT en linfocitos T durante la migración. Así, se ha observado que existe una población de microtúbulos que emerge del centrosoma que son necesarios para la estabilidad del urópodo. La activación de la GTPasa RhoA durante la migración lleva a una estimulación de su efector ROCK, que a través de la regulación de la miosina II favorece la contractilidad de la actomiosina y la desestabilización de los microtúbulos (Takesono, A. *et al.*, 2010). También se ha observado que RhoA inhibe a la HDAC6 que es una deacetilasa de la tubulina, lo que aumenta el contenido de Acet-MT (Ling, L. y Lobie, P.E., 2004). Se ha descrito que durante la formación de la SI, la señalización por el TCR hace que disminuya la actividad de RhoA lo que conduce a la inhibición de la migración, y a la activación de Rac1 mientras que no se observan cambios en Cdc42. Rac1 en SI reduce los niveles de fosforilación de las proteínas ERM (ezrina, radicina, moesina) lo que reduce la rigidez cortical y promueve la formación de conjugados, y aumenta la fosforilación de la proteína Stahtmin, seguramente a través de Pak1, inhibiéndola y permitiendo así que no desestabilice a los microtúbulos (Cernuda-Morollon, E. *et al.*, 2010).

Dado el paralelismo encontrado entre la reorientación del centrosoma y la formación de Glu-MT y el requerimiento de INF2 para ambos procesos, investigamos el requerimiento de RhoA, Rac1 o Cdc42 en este proceso silenciando cada una de estas GTPasas de forma individual. Nuestros datos indican que tanto Rac1 como Cdc42, pero no RhoA, son necesarias para la generación de los Glu-MT en la sinapsis inmunológica. No conocemos el momento preciso en el que Rac1 y Cdc42 actúan en los procesos de reorientación del centrosoma y formación de los microtúbulos estables de tipo Glu-MT, pero es posible que lo hagan en momentos diferentes. Lo cierto es que ambas proteínas interaccionan con INF2 y podrían regularla ya que INF2 es necesaria para ambos procesos. En los fibroblastos la regulación de la reorientación del centrosoma y la formación de Glu-MT está mediada de forma diferente a lo observado por nosotros en linfocitos T, ya que Cdc42 controla el primer proceso, mientras que el segundo es regulado por RhoA (Gomes, E.R. *et al.*, 2005). Estas diferencias posiblemente sean específicas de cada tipo celular, porque en los fibroblastos permanece estático el centrosoma y lo que realmente se mueve es el núcleo, mientras que durante la formación de la SI existe un movimiento claro del centrosoma del linfocito T.

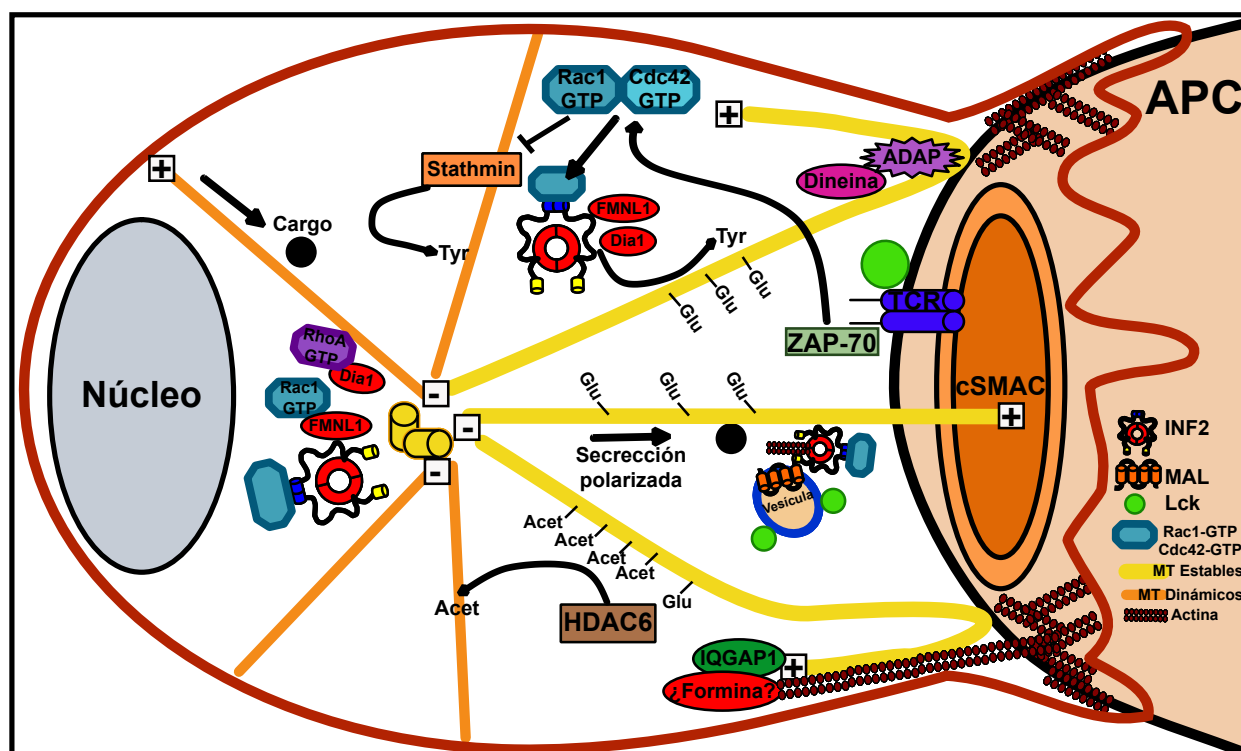


Figura 5.6. Esquema de la polarización del centrosoma y de la estabilización de microtúbulos durante la formación de la SI. Tras la activación del TCR se produce una activación de las RhoGTPasas que regulan a las forminas Dia1, FMNL1 e INF2, necesarias para la polarización del centrosoma. Las proteínas +TIP de extremo + de los microtúbulos se anclarían a complejos receptores formados por IQGAP1. Con la participación de la proteína adenomatous poliposis coli y forminas como Dia1 e INF2, los microtúbulos anclados se estabilizarían. El complejo dineína-ADAP tiraría de los microtúbulos anclados al pSMAC para mover al centrosoma hacia la sinapsis. Los microtúbulos estabilizados sufrirían modificaciones postraduccionales como la detirosinación y/o acilación y serían también utilizados para el transporte vesicular polarizado de moléculas a la SI con la participación de proteínas motoras como las kinesinas o de INF2, como hemos visto para el caso de Lck.

9. La reorientación del centrosoma y la formación de Glu-MT está regulada por forminas en linfocitos T

Las forminas Dia1 y FMNL1 son necesarias para la reorientación del centrosoma hacia la zona de contacto en la SI (Gomez, T.S. *et al.*, 2007). Nuestros experimentos muestran que INF2 también es requerida para este proceso. Por otra parte, mDia 1 regula la formación de Glu-MT en los fibroblastos (Palazzo, A.F. *et al.*, 2001a). En nuestro estudio observamos que tanto Dia1 (el análogo humano de mDia1) y FMNL1 como INF2 son para que se produzca la formación de Glu-MT establecen respuesta a la activación del linfocito T. Por lo tanto, la pérdida de cualquiera de estas tres forminas (INF2, Dia1 o FMNL1) afecta tanto a la reorientación del centrosoma como a la ruta de formación de Glu-MT. Es posible, por lo tanto que existan varias rutas independientes mediadas por forminas y reguladas por RhoGTPasas que tengan que actuar simultáneamente para ambos procesos tengan lugar o bien que estas rutas sean convergentes y que alguna de estas forminas actúe en su intersección.

Observaciones llevadas a cabo en colaboración con el Dr. G. Gundersen (Columbia

University, NY, USA) en fibroblastos indican que tanto Dia1 como INF2 son necesarias para la generación de Glu-MT en respuesta a suero o ácido lisofosfatídico (resultados no mostrados). Este resultado abre también en fibroblastos varias posibilidades nuevas sobre la regulación de la formación de los Glu-MT estables (Fig. 5.7 A). En principio, es posible que: A) tras la activación de la célula se induzcan dos rutas independientes, una dependiente de INF2 y la otra de Dia1. En este caso se generarían dos poblaciones independientes de Glu-MT, ó B y C) sólo exista una ruta en la que INF2 actuaría por delante de Dia1 (B) o Dia1 por delante de INF2 (C). La primera posibilidad quedaría descartada porque no se observan Glu-MT tanto si es mDia1 o INF2 la formina silenciada. Por otra parte, el doble silenciamiento de ambas forminas no tiene un efecto mayor sobre los Glu-MT que su silenciamiento individual. Además, la capacidad de Dia1 de generar Glu-MT depende de la expresión de INF2 ya que formas activadas de mDia1 no inducen la formación de Glu-MT en ausencia de la expresión de INF2. Por lo tanto, al menos en fibroblastos, parece que INF2 estaría situada en la misma ruta que mDia1, actuando en un paso del proceso posterior al que interviene Dia1. Quedaría por resolver cómo en fibroblastos Dia1, que es regulada por RhoA e INF2, que es regulada por Rac1 y Cdc42, actúan en la misma ruta (Fig. 5.7. B). Una posibilidad es que el ácido lisofosfatídico, factor del suero que activa a RhoA, active también a Cdc42.

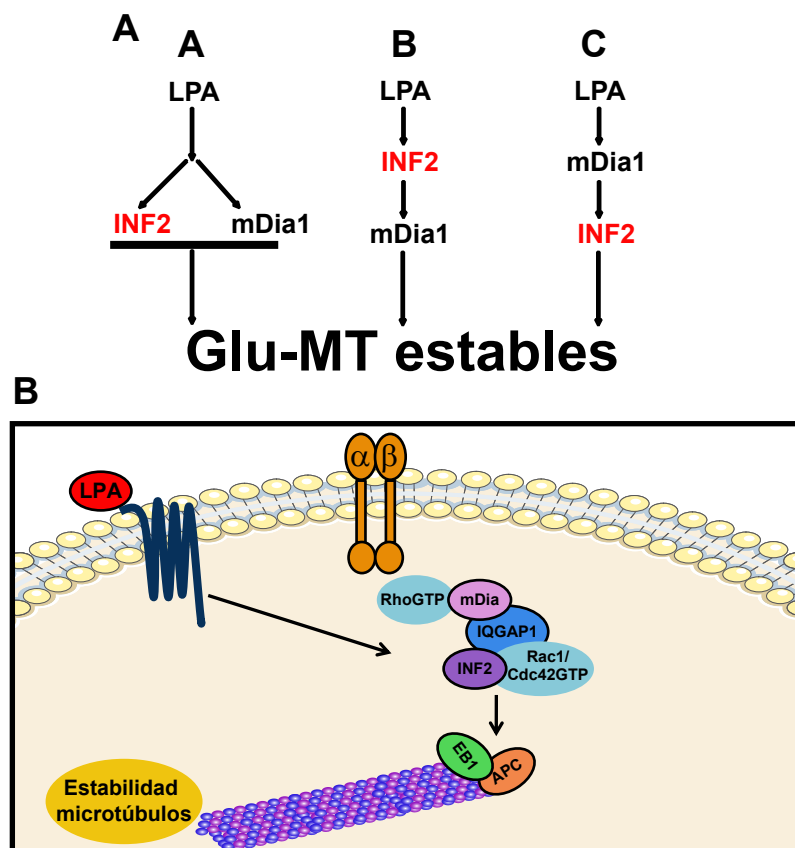


Figura 5.7 Ruta de forminas. (A) Hipótesis de la posible existencia de rutas paralela o secuenciales para la estabilización de microtúbulos por las forminas Dia1 e INF2. (B) Modelo del proceso de la estabilización de microtúbulos por la ruta mDia-INF2.

10. EL FH2 como dominio responsable de la unión a microtúbulos y de la formación de Glu-MT

Nuestros experimentos muestran que la expresión del dominio FH2 de INF2 es capaz de restaurar la reorientación del centrosoma y la formación de Glu-MT en células Jurkat silenciadas para la proteína INF2 endógena. INF2 y su dominio FH2 son capaces de estabilizar a los microtúbulos sin requerir de su actividad nucleadora de actina, tal y como ocurre también para la formina mDia2 (Bartolini, F. *et al.*, 2008). Análogamente a mDia2 (Bartolini, F. *et al.*, 2008), INF2 puede unirse a los microtúbulos *in vitro* y estabilizarlos. Por lo tanto, los dominios FH2 de INF2 y Dia2 son de vital importancia para el papel de estas dos forminas en la reorientación del centrosoma y la formación de Glu-MT estables en linfocitos T. El dominio FH2 se encuentra muy conservado dentro de la familia de las forminas (Higgs, H.N. y Peterson, K.J., 2005; Goode, B.L. y Eck, M.J., 2007). Por lo tanto, es posible que otras forminas, como hemos visto también para el caso de FMNL1, presenten las mismas actividades que INF2 y Dia1 y puedan intervenir también en ambos procesos, aunque no todas las forminas actúan del mismo modo ya que al menos la formina DAAM1 no estabiliza microtúbulos.

11. Papel de los Glu-MT estables en la reorientación del centrosoma y el transporte vesicular polarizado

Los microtúbulos se unen a la membrana mediante el reconocimiento de las proteínas +TIPs (como las proteínas EB1-EB3, CLIP-170 y otras) unidas a su extremo de crecimiento o extremo + con proteínas receptoras ancladas al citoesqueleto de actina cortical. Tanto los microtúbulos dinámicos como los microtúbulos estables necesitan anclarse a proteínas subcorticales por lo que los complejos receptores deben ser diferentes en ambos casos. Entre las proteínas receptoras se encuentran IQGAP1, una proteína con múltiples dominios regulada por Cdc42 (Brandt, D.T. *et al.*, 2007). En la estabilización de microtúbulos interviene además un complejo formado por EB1, la proteína adenomatous polyposis coli y mDia1, entre otras. Una vez estabilizados, estos microtúbulos podrían ser utilizados por la dineína unida a la proteína ADAP en el SMAC para tirar del centrosoma y dirigirlo enfrente de la SI. Una vez reorientado el centrosoma y todo el aparato exocítico asociado con él, los microtúbulos estables podrían ser utilizados como carriles para el tráfico vesicular polarizado a la SI. Así, en sinapsis formadas por los linfocitos T citotóxicos con su célula diana, el centrosoma se coloca enfrente de la SI y de manera paralela al contacto de forma que el haz de microtúbulos interacciona lateralmente con la sinapsis donde también se ha encontrado a la proteína IQGAP1 (Stinchcombe, J.C. *et al.*, 2006). Los microtúbulos formarían un cono cuya base sería el SMAC, que es el lugar en el que los gránulos líticos son secretados hacia la célula diana. Nuestro trabajo, sugiere un papel crucial para INF2 en los procesos de reorientación del centrosoma y en la formación de Glu-MT estables y por lo tanto, en la función del linfocito T.

6.-CONCLUSIONES

1. La forma INF2 se une a la proteína MAL y regula la formación de las vesículas MAL⁺ que transportan Lck a la membrana plasmática en los linfocitos T.
2. INF2 se une a los microtúbulos de manera directa y esto podría facilitar el movimiento de las vesículas MAL⁺ a lo largo de los microtúbulos.
3. La dinámica de actina es necesaria para el transporte de Lck a membrana plasmática.
4. Tanto la actividad polimerizadora como la despolimerizadora de actina de INF2 son requeridas para que se produzca de forma eficiente el transporte de Lck.
5. INF2 es necesaria para la reorientación del centrosoma a la sinapsis inmunológica.
6. La activación del linfocito T induce la formación de microtúbulos estables del tipo Glu-microtúbulos, proceso que requiere la expresión de INF2.
7. El dominio FH2 de INF2 es suficiente para restaurar tanto la polarización del centrosoma, como la generación de microtúbulos estables en células silenciadas para la proteína INF2 endógena. Las actividades de INF2 relacionadas con la dinámica de actina no son necesarias para ninguno de estos dos procesos.
8. Las RhoGTPasas Rac1 y Cdc42 se unen a INF2 y regulan el transporte de Lck a la membrana plasmática en los linfocitos T en estado estacionario, y la reorientación del centrosoma y la formación de microtúbulos estables del tipo Glu-microtúbulos en los linfocitos T activados, procesos en los que INF2 tiene una participación esencial.

BIBLIOGRAFÍA

- Abdul-Manan, N., Aghazadeh, B., Liu, G.A., Majumdar, A., Ouerfelli, O., Siminovitch, K.A. y Rosen, M.K. (1999). Structure of Cdc42 in complex with the GTPase-binding domain of the 'Wiskott-Aldrich syndrome' protein. *Nature*. **399**, 379-383.
- Akhmanova, A. y Steinmetz, M.O. (2008). Tracking the ends: a dynamic protein network controls the fate of microtubule tips. *Nat Rev Mol Cell Biol*. **9**, 309-322.
- Alonso, M.A. y Millan, J. (2001). The role of lipid rafts in signalling and membrane trafficking in T lymphocytes. *J Cell Sci*. **114**, 3957-3965.
- Alonso, M.A. y Weissman, S.M. (1987). cDNA cloning and sequence of MAL, a hydrophobic protein associated with human T-cell differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **84**, 1997-2001.
- Andres-Delgado, L., Anton, O.M., Madrid, R., Byrne, J.A. y Alonso, M.A. (2010). Formin INF2 regulates MAL-mediated transport of Lck to the plasma membrane of human T lymphocytes. *Blood*. **116**, 5919-5929.
- Anton, O., Batista, A., Millan, J., Andres-Delgado, L., Puertollano, R., Correas, I. y Alonso, M.A. (2008). An essential role for the MAL protein in targeting Lck to the plasma membrane of human T lymphocytes. *J Exp Med*. **205**, 3201-3213.
- Barr, V.A., Balagopalan, L., Barda-Saad, M., Polishchuk, R., Boukari, H., Bunnell, S.C., Bernot, K.M., Toda, Y., Nossal, R. y Samelson, L.E. (2006). T-cell antigen receptor-induced signaling complexes: internalization via a cholesterol-dependent endocytic pathway. *Traffic*. **7**, 1143-1162.
- Bartolini, F. y Gundersen, G.G. (2009). Formins and microtubules. *Biochim Biophys Acta*. **1803**, 164-173.
- Bartolini, F., Moseley, J.B., Schmoranzler, J., Cassimeris, L., Goode, B.L. y Gundersen, G.G. (2008). The formin mDia2 stabilizes microtubules independently of its actin nucleation activity. *J Cell Biol*. **181**, 523-536.
- Batista, A., Millan, J., Mittelbrunn, M., Sanchez-Madrid, F. y Alonso, M.A. (2004). Recruitment of transferrin receptor to immunological synapse in response to TCR engagement. *J Immunol*. **172**, 6709-6714.
- Bergman, M., Mustelin, T., Oetken, C., Partanen, J., Flint, N.A., Amrein, K.E., Autero, M., Burn, P. y Alitalo, K. (1992). The human p50csk tyrosine kinase phosphorylates p56lck at Tyr-505 and down regulates its catalytic activity. *EMBO J*. **11**, 2919-2924.
- Bijlmakers, M.J. y Marsh, M. (1999). Trafficking of an acylated cytosolic protein: newly synthesized p56(lck) travels to the plasma membrane via the exocytic pathway. *J Cell Biol*. **145**, 457-468.
- Billadeau, D.D., Nolz, J.C. y Gomez, T.S. (2007). Regulation of T-cell activation by the cytoskeleton. *Nat Rev Immunol*. **7**, 131-143.

- Bonello, G., Blanchard, N., Montoya, M.C., Aguado, E., Langlet, C., He, H.T., Nunez-Cruz, S., Malissen, M., Sanchez-Madrid, F., Olive, D., Hivroz, C. y Collette, Y. (2004). Dynamic recruitment of the adaptor protein LAT: LAT exists in two distinct intracellular pools and controls its own recruitment. *J Cell Sci.* **117**, 1009-1016.
- Brandt, D.T., Marion, S., Griffiths, G., Watanabe, T., Kaibuchi, K. y Grosse, R. (2007). Dia1 and IQGAP1 interact in cell migration and phagocytic cup formation. *J Cell Biol.* **178**, 193-200.
- Brown, D.A. y London, E. (1997). Structure of detergent-resistant membrane domains: does phase separation occur in biological membranes? *Biochem Biophys Res Commun.* **240**, 1-7.
- Brown, E.J., Schlondorff, J.S., Becker, D.J., Tsukaguchi, H., Tonna, S.J., Uscinski, A.L., Higgs, H.N., Henderson, J.M. y Pollak, M.R. (2009). Mutations in the formin gene INF2 cause focal segmental glomerulosclerosis. *Nat Genet.* **42**, 72-76.
- Brummelkamp, T.R., Bernards, R. y Agami, R. (2002). A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells. *Science.* **296**, 550-553.
- Bulinski, J.C. y Gundersen, G.G. (1991). Stabilization of post-translational modification of microtubules during cellular morphogenesis. *Bioessays.* **13**, 285-293.
- Bunnell, S.C., Kapoor, V., Tribble, R.P., Zhang, W. y Samelson, L.E. (2001). Dynamic actin polymerization drives T cell receptor-induced spreading: a role for the signal transduction adaptor LAT. *Immunity.* **14**, 315-329.
- Butler, B. y Cooper, J.A. (2009). Distinct roles for the actin nucleators Arp2/3 and hDia1 during NK-mediated cytotoxicity. *Curr Biol.* **19**, 1886-1896.
- Cernuda-Morollon, E., Millan, J., Shipman, M., Marelli-Berg, F.M. y Ridley, A.J. (2010). Rac activation by the T-cell receptor inhibits T cell migration. *PLoS One.* **5**,
- Combs, J., Kim, S.J., Tan, S., Ligon, L.A., Holzbaur, E.L., Kuhn, J. y Poenie, M. (2006). Recruitment of dynein to the Jurkat immunological synapse. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **103**, 14883-14888.
- Crotzer, V.L., Mabardy, A.S., Weiss, A. y Brodsky, F.M. (2004). T cell receptor engagement leads to phosphorylation of clathrin heavy chain during receptor internalization. *J Exp Med.* **199**, 981-991.
- Cheong, K.H., Zacchetti, D., Schneeberger, E.E. y Simons, K. (1999). VIP17/MAL, a lipid raft-associated protein, is involved in apical transport in MDCK cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **96**, 6241-6248.
- Chhabra, E.S. y Higgs, H.N. (2006). INF2 Is a WASP homology 2 motif-containing formin that severs actin filaments and accelerates both polymerization and depolymerization. *J Biol Chem.* **281**, 26754-26767.
- Chhabra, E.S., Ramabhadran, V., Gerber, S.A. y Higgs, H.N. (2009). INF2 is an endoplasmic reticulum-associated formin protein. *J Cell Sci.* **122**, 1430-1440.

- Das, V., Nal, B., Dujancourt, A., Thoulouze, M.I., Galli, T., Roux, P., Dautry-Varsat, A. y Alcover, A. (2004). Activation-induced polarized recycling targets T cell antigen receptors to the immunological synapse; involvement of SNARE complexes. *Immunity*. **20**, 577-588.
- de Marco, M.C., Martin-Belmonte, F., Kremer, L., Albar, J.P., Correas, I., Vaerman, J.P., Marazuela, M., Byrne, J.A. y Alonso, M.A. (2002). MAL2, a novel raft protein of the MAL family, is an essential component of the machinery for transcytosis in hepatoma HepG2 cells. *J Cell Biol.* **159**, 37-44.
- de Marco, M.C., Puertollano, R., Martinez-Menarguez, J.A. y Alonso, M.A. (2006). Dynamics of MAL2 during glycosylphosphatidylinositol-anchored protein transcytotic transport to the apical surface of hepatoma HepG2 cells. *Traffic*. **7**, 61-73.
- Dustin, M.L. y Cooper, J.A. (2000). The immunological synapse and the actin cytoskeleton: molecular hardware for T cell signaling. *Nat Immunol.* **1**, 23-29.
- Ehrlich, L.I., Ebert, P.J., Krummel, M.F., Weiss, A. y Davis, M.M. (2002). Dynamics of p56lck translocation to the T cell immunological synapse following agonist and antagonist stimulation. *Immunity*. **17**, 809-822.
- Eisenmann, K.M., West, R.A., Hildebrand, D., Kitchen, S.M., Peng, J., Sigler, R., Zhang, J., Siminovitch, K.A. y Alberts, A.S. (2007). T cell responses in mammalian diaphanous-related formin mDia1 knock-out mice. *J Biol Chem.* **282**, 25152-25158.
- Eng, C.H., Huckaba, T.M. y Gundersen, G.G. (2006). The formin mDia regulates GSK3beta through novel PKCs to promote microtubule stabilization but not MTOC reorientation in migrating fibroblasts. *Mol Biol Cell.* **17**, 5004-5016.
- Evangelista, M., Zigmond, S. y Boone, C. (2003). Formins: signaling effectors for assembly and polarization of actin filaments. *J Cell Sci.* **116**, 2603-2611.
- Fanayan, S., Shehata, M., Agterof, A.P., McGuckin, M.A., Alonso, M.A. y Byrne, J.A. (2009). Mucin 1 (MUC1) is a novel partner for MAL2 in breast carcinoma cells. *BMC Cell Biol.* **10**, 7.
- Fernandez-Borja, M., Janssen, L., Verwoerd, D., Hordijk, P. y Neefjes, J. (2005). RhoB regulates endosome transport by promoting actin assembly on endosomal membranes through Dia1. *J Cell Sci.* **118**, 2661-2670.
- Formaggio, E., Cantu, C., Chiamulera, C. y Fumagalli, G.F. (2008). p75 neurotrophin receptor distribution and transport in cultured neurons. *Neurosci Res.* **62**, 32-42.
- Gasman, S., Kalaidzidis, Y. y Zerial, M. (2003). RhoD regulates endosome dynamics through Diaphanous-related Formin and Src tyrosine kinase. *Nat Cell Biol.* **5**, 195-204.
- Gomes, E.R., Jani, S. y Gundersen, G.G. (2005). Nuclear movement regulated by Cdc42, MRCK, myosin, and actin flow establishes MTOC polarization in migrating cells. *Cell.* **121**, 451-463.

- Gomez, T.S., Kumar, K., Medeiros, R.B., Shimizu, Y., Leibson, P.J. y Billadeau, D.D. (2007). Formins regulate the actin-related protein 2/3 complex-independent polarization of the centrosome to the immunological synapse. *Immunity*. **26**, 177-190.
- Goode, B.L. y Eck, M.J. (2007). Mechanism and function of formins in the control of actin assembly. *Annu Rev Biochem*. **76**, 593-627.
- Gorska, M.M., Liang, Q., Karim, Z. y Alam, R. (2009). Uncoordinated 119 protein controls trafficking of Lck via the Rab11 endosome and is critical for immunological synapse formation. *J Immunol*. **183**, 1675-1684.
- Gundersen, G.G., Kalnoski, M.H. y Bulinski, J.C. (1984). Distinct populations of microtubules: tyrosinated and nontyrosinated alpha tubulin are distributed differently in vivo. *Cell*. **38**, 779-789.
- Haller, C., Rauch, S. y Fackler, O.T. (2007). HIV-1 Nef employs two distinct mechanisms to modulate Lck subcellular localization and TCR induced actin remodeling. *PLoS One*. **2**, e1212.
- Heasman, S.J. y Ridley, A.J. (2008). Mammalian Rho GTPases: new insights into their functions from in vivo studies. *Nat Rev Mol Cell Biol*. **9**, 690-701.
- Higgs, H.N. y Peterson, K.J. (2005). Phylogenetic analysis of the formin homology 2 domain. *Mol Biol Cell*. **16**, 1-13.
- Huppa, J.B. y Davis, M.M. (2003). T-cell-antigen recognition and the immunological synapse. *Nat Rev Immunol*. **3**, 973-983.
- Ishizaki, T., Morishima, Y., Okamoto, M., Furuyashiki, T., Kato, T. y Narumiya, S. (2001). Coordination of microtubules and the actin cytoskeleton by the Rho effector mDia1. *Nat Cell Biol*. **3**, 8-14.
- Kabouridis, P.S., Magee, A.I. y Ley, S.C. (1997). S-acylation of LCK protein tyrosine kinase is essential for its signalling function in T lymphocytes. *EMBO J*. **16**, 4983-4998.
- Kovar, D.R. y Pollard, T.D. (2004). Progressing actin: Formin as a processive elongation machine. *Nat Cell Biol*. **6**, 1158-1159.
- Kozlov, M.M. y Bershadsky, A.D. (2004). Processive capping by formin suggests a force-driven mechanism of actin polymerization. *J Cell Biol*. **167**, 1011-1017.
- Krebs, A., Rothkegel, M., Klar, M. y Jockusch, B.M. (2001). Characterization of functional domains of mDia1, a link between the small GTPase Rho and the actin cytoskeleton. *J Cell Sci*. **114**, 3663-3672.
- Kreitzer, G., Marmorstein, A., Okamoto, P., Vallee, R. y Rodriguez-Boulan, E. (2000). Kinesin and dynamin are required for post-Golgi transport of a plasma-membrane protein. *Nat Cell Biol*. **2**, 125-127.

- Kuhn, J.R. y Poenie, M. (2002). Dynamic polarization of the microtubule cytoskeleton during CTL-mediated killing. *Immunity*. **16**, 111-121.
- Kuhne, M.R., Lin, J., Yablonski, D., Mollenauer, M.N., Ehrlich, L.I., Huppa, J., Davis, M.M. y Weiss, A. (2003). Linker for activation of T cells, zeta-associated protein-70, and Src homology 2 domain-containing leukocyte protein-76 are required for TCR-induced microtubule-organizing center polarization. *J Immunol*. **171**, 860-866.
- Kupfer, A. y Dennert, G. (1984). Reorientation of the microtubule-organizing center and the Golgi apparatus in cloned cytotoxic lymphocytes triggered by binding to lysable target cells. *J Immunol*. **133**, 2762-2766.
- Lee, H.K., Han, K.H., Jung, Y.H., Kang, H.G., Moon, K.C., Ha, I.S., Choi, Y. y Cheong, H.I. (2010). Variable renal phenotype in a family with an INF2 mutation. *Pediatr Nephrol*.
- Lee, K.H., Dinner, A.R., Tu, C., Campi, G., Raychaudhuri, S., Varma, R., Sims, T.N., Burack, W.R., Wu, H., Wang, J., Kanagawa, O., Markiewicz, M., Allen, P.M., Dustin, M.L., Chakraborty, A.K. y Shaw, A.S. (2003). The immunological synapse balances T cell receptor signaling and degradation. *Science*. **302**, 1218-1222.
- Ling, L. y Lobie, P.E. (2004). RhoA/ROCK activation by growth hormone abrogates p300/histone deacetylase 6 repression of Stat5-mediated transcription. *J Biol Chem*. **279**, 32737-32750.
- Madrid, R., Aranda, J.F., Rodriguez-Fraticelli, A.E., Ventimiglia, L., Andres-Delgado, L., Shehata, M., Fanayan, S., Shahheydari, H., Gomez, S., Jimenez, A., Martin-Belmonte, F., Byrne, J.A. y Alonso, M.A. (2010). The formin INF2 regulates basolateral-to-apical transcytosis and lumen formation in association with Cdc42 and MAL2. *Dev Cell*. **18**, 814-827.
- Martin-Belmonte, F., Puertollano, R., Millan, J. y Alonso, M.A. (2000). The MAL proteolipid is necessary for the overall apical delivery of membrane proteins in the polarized epithelial Madin-Darby canine kidney and fischer rat thyroid cell lines. *Mol Biol Cell*. **11**, 2033-2045.
- Martin-Cofreces, N.B., Robles-Valero, J., Cabrero, J.R., Mittelbrunn, M., Gordon-Alonso, M., Sung, C.H., Alarcon, B., Vazquez, J. y Sanchez-Madrid, F. (2008). MTOC translocation modulates IS formation and controls sustained T cell signaling. *J Cell Biol*. **182**, 951-962.
- Martin-Cofreces, N.B., Sancho, D., Fernandez, E., Vicente-Manzanares, M., Gordon-Alonso, M., Montoya, M.C., Michel, F., Acuto, O., Alarcon, B. y Sanchez-Madrid, F. (2006). Role of Fyn in the rearrangement of tubulin cytoskeleton induced through TCR. *J Immunol*. **176**, 4201-4207.
- Mellman, I. y Nelson, W.J. (2008). Coordinated protein sorting, targeting and distribution in polarized cells. *Nat Rev Mol Cell Biol*. **9**, 833-845.
- Miletic, A.V., Swat, M., Fujikawa, K. y Swat, W. (2003). Cytoskeletal remodeling in lymphocyte activation. *Curr Opin Immunol*. **15**, 261-268.

- Millan, J. y Alonso, M.A. (1998). MAL, a novel integral membrane protein of human T lymphocytes, associates with glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins and Src-like tyrosine kinases. *Eur J Immunol.* **28**, 3675-3684.
- Millan, J., de Marco, M.C., Qaidi, M., Batista, A., Martin-Belmonte, F. y Alonso, M.A. (2003). Isolation of lipid raft-associated proteolipids. *Methods Mol Biol.* **228**, 223-230.
- Millan, J., Montoya, M.C., Sancho, D., Sanchez-Madrid, F. y Alonso, M.A. (2002). Lipid rafts mediate biosynthetic transport to the T lymphocyte uropod subdomain and are necessary for uropod integrity and function. *Blood.* **99**, 978-984.
- Millan, J., Puertollano, R., Fan, L., Rancano, C. y Alonso, M.A. (1997). The MAL proteolipid is a component of the detergent-insoluble membrane subdomains of human T-lymphocytes. *Biochem J.* **321** (Pt 1), 247-252.
- Millan, J., Qaidi, M. y Alonso, M.A. (2001). Segregation of co-stimulatory components into specific T cell surface lipid rafts. *Eur J Immunol.* **31**, 467-473.
- Monks, C.R., Freiberg, B.A., Kupfer, H., Sciaky, N. y Kupfer, A. (1998). Three-dimensional segregation of supramolecular activation clusters in T cells. *Nature.* **395**, 82-86.
- Montixi, C., Langlet, C., Bernard, A.M., Thimonier, J., Dubois, C., Wurbel, M.A., Chauvin, J.P., Pierres, M. y He, H.T. (1998). Engagement of T cell receptor triggers its recruitment to low-density detergent-insoluble membrane domains. *EMBO J.* **17**, 5334-5348.
- Moseley, J.B., Sagot, I., Manning, A.L., Xu, Y., Eck, M.J., Pellman, D. y Goode, B.L. (2004). A conserved mechanism for Bni1- and mDia1-induced actin assembly and dual regulation of Bni1 by Bud6 and profilin. *Mol Biol Cell.* **15**, 896-907.
- Palazzo, A., Ackerman, B. y Gundersen, G.G. (2003). Cell biology: Tubulin acetylation and cell motility. *Nature.* **421**, 230.
- Palazzo, A.F., Cook, T.A., Alberts, A.S. y Gundersen, G.G. (2001a). mDia mediates Rho-regulated formation and orientation of stable microtubules. *Nat Cell Biol.* **3**, 723-729.
- Palazzo, A.F., Joseph, H.L., Chen, Y.J., Dujardin, D.L., Alberts, A.S., Pfister, K.K., Vallee, R.B. y Gundersen, G.G. (2001b). Cdc42, dynein, and dynactin regulate MTOC reorientation independent of Rho-regulated microtubule stabilization. *Curr Biol.* **11**, 1536-1541.
- Penninger, J.M., Irie-Sasaki, J., Sasaki, T. y Oliveira-dos-Santos, A.J. (2001). CD45: new jobs for an old acquaintance. *Nat Immunol.* **2**, 389-396.
- Peris, L., Wagenbach, M., Lafanechere, L., Brocard, J., Moore, A.T., Kozielski, F., Job, D., Wordeman, L. y Andrieux, A. (2009). Motor-dependent microtubule disassembly driven by tubulin tyrosination. *J Cell Biol.* **185**, 1159-1166.
- Pirone, D.M., Fukuhara, S., Gutkind, J.S. y Burbelo, P.D. (2000). SPECs, small binding proteins for Cdc42. *J Biol Chem.* **275**, 22650-22656.

- Ploubidou, A. y Way, M. (2001). Viral transport and the cytoskeleton. *Curr Opin Cell Biol.* **13**, 97-105.
- Puertollano, R. y Alonso, M.A. (1999). MAL, an integral element of the apical sorting machinery, is an itinerant protein that cycles between the trans-Golgi network and the plasma membrane. *Mol Biol Cell.* **10**, 3435-3447.
- Puertollano, R., Martin-Belmonte, F., Millan, J., de Marco, M.C., Albar, J.P., Kremer, L. y Alonso, M.A. (1999). The MAL proteolipid is necessary for normal apical transport and accurate sorting of the influenza virus hemagglutinin in Madin-Darby canine kidney cells. *J Cell Biol.* **145**, 141-151.
- Ridley, A.J. (2006). Rho GTPases and actin dynamics in membrane protrusions and vesicle trafficking. *Trends Cell Biol.* **16**, 522-529.
- Rodgers, W., Crise, B. y Rose, J.K. (1994). Signals determining protein tyrosine kinase and glycosyl-phosphatidylinositol-anchored protein targeting to a glycolipid-enriched membrane fraction. *Mol Cell Biol.* **14**, 5384-5391.
- Rodriguez-Boulán, E., Kreitzer, G. y Musch, A. (2005). Organization of vesicular trafficking in epithelia. *Nat Rev Mol Cell Biol.* **6**, 233-247.
- Rose, R., Weyand, M., Lammers, M., Ishizaki, T., Ahmadian, M.R. y Wittinghofer, A. (2005). Structural and mechanistic insights into the interaction between Rho and mammalian Dia. *Nature.* **435**, 513-518.
- Sakata, D., Taniguchi, H., Yasuda, S., Adachi-Morishima, A., Hamazaki, Y., Nakayama, R., Miki, T., Minato, N. y Narumiya, S. (2007). Impaired T lymphocyte trafficking in mice deficient in an actin-nucleating protein, mDia1. *J Exp Med.* **204**, 2031-2038.
- Sanchez-Pulido, L., Martin-Belmonte, F., Valencia, A. y Alonso, M.A. (2002). MARVEL: a conserved domain involved in membrane apposition events. *Trends Biochem Sci.* **27**, 599-601.
- Schneider, U. y Schwenk, H.U. (1977). Characterization of "T" and "non-T" cell lines established from children with acute lymphoblastic leukemia and non-Hodgkin lymphoma after leukemic transformation. *Haematol Blood Transfus.* **20**, 265-269.
- Schwartzberg, P.L. (2007). Formin the way. *Immunity.* **26**, 139-141.
- Sedwick, C.E., Morgan, M.M., Jusino, L., Cannon, J.L., Miller, J. y Burkhardt, J.K. (1999). TCR, LFA-1, and CD28 play unique and complementary roles in signaling T cell cytoskeletal reorganization. *J Immunol.* **162**, 1367-1375.
- Serrador, J.M., Cabrero, J.R., Sancho, D., Mittelbrunn, M., Urzainqui, A. y Sanchez-Madrid, F. (2004). HDAC6 deacetylase activity links the tubulin cytoskeleton with immune synapse organization. *Immunity.* **20**, 417-428.

- Shenoy-Scaria, A.M., Gauen, L.K., Kwong, J., Shaw, A.S. y Lublin, D.M. (1993). Palmitoylation of an amino-terminal cysteine motif of protein tyrosine kinases p56lck and p59fyn mediates interaction with glycosyl-phosphatidylinositol-anchored proteins. *Mol Cell Biol.* **13**, 6385-6392.
- Simons, K. y Wandinger-Ness, A. (1990). Polarized sorting in epithelia. *Cell.* **62**, 207-210.
- Stinchcombe, J.C. y Griffiths, G.M. (2003). The role of the secretory immunological synapse in killing by CD8+ CTL. *Semin Immunol.* **15**, 301-305.
- Stinchcombe, J.C., Majorovits, E., Bossi, G., Fuller, S. y Griffiths, G.M. (2006). Centrosome polarization delivers secretory granules to the immunological synapse. *Nature.* **443**, 462-465.
- Stowers, L., Yelon, D., Berg, L.J. y Chant, J. (1995). Regulation of the polarization of T cells toward antigen-presenting cells by Ras-related GTPase CDC42. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **92**, 5027-5031.
- Takesono, A., Heasman, S.J., Wojciak-Stothard, B., Garg, R. y Ridley, A.J. (2010). Microtubules regulate migratory polarity through Rho/ROCK signaling in T cells. *PLoS One.* **5**, e8774.
- Taunton, J. (2001). Actin filament nucleation by endosomes, lysosomes and secretory vesicles. *Curr Opin Cell Biol.* **13**, 85-91.
- Vetter, I.R. y Wittinghofer, A. (2001). The guanine nucleotide-binding switch in three dimensions. *Science.* **294**, 1299-1304.
- Vicente-Manzanares, M., Rey, M., Perez-Martinez, M., Yanez-Mo, M., Sancho, D., Cabrero, J.R., Barreiro, O., de la Fuente, H., Itoh, K. y Sanchez-Madrid, F. (2003). The RhoA effector mDia is induced during T cell activation and regulates actin polymerization and cell migration in T lymphocytes. *J Immunol.* **171**, 1023-1034.
- Wallar, B.J., Deward, A.D., Resau, J.H. y Alberts, A.S. (2007). RhoB and the mammalian Diaphanous-related formin mDia2 in endosome trafficking. *Exp Cell Res.* **313**, 560-571.
- Wallar, B.J., Stropich, B.N., Schoenherr, J.A., Holman, H.A., Kitchen, S.M. y Alberts, A.S. (2006). The basic region of the diaphanous-autoregulatory domain (DAD) is required for autoregulatory interactions with the diaphanous-related formin inhibitory domain. *J Biol Chem.* **281**, 4300-4307.
- Wen, Y., Eng, C.H., Schmoranzler, J., Cabrera-Poch, N., Morris, E.J., Chen, M., Wallar, B.J., Alberts, A.S. y Gundersen, G.G. (2004). EB1 and APC bind to mDia to stabilize microtubules downstream of Rho and promote cell migration. *Nat Cell Biol.* **6**, 820-830.
- Xavier, R., Brennan, T., Li, Q., McCormack, C. y Seed, B. (1998). Membrane compartmentation is required for efficient T cell activation. *Immunity.* **8**, 723-732.

- Xu, H. y Littman, D.R. (1993). A kinase-independent function of Lck in potentiating antigen-specific T cell activation. *Cell*. **74**, 633-643.
- Yamaguchi, H. y Hendrickson, W.A. (1996). Structural basis for activation of human lymphocyte kinase Lck upon tyrosine phosphorylation. *Nature*. **384**, 484-489.
- Young, K.G., Thurston, S.F., Copeland, S., Smallwood, C. y Copeland, J.W. (2008). INF1 is a novel microtubule-associated formin. *Mol Biol Cell*. **19**, 5168-5180.
- Zhang, W., Tribble, R.P. y Samelson, L.E. (1998). LAT palmitoylation: its essential role in membrane microdomain targeting and tyrosine phosphorylation during T cell activation. *Immunity*. **9**, 239-246.
- Zigmond, S.H. (2004). Formin-induced nucleation of actin filaments. *Curr Opin Cell Biol*. **16**, 99-105.
- Zimmermann, L., Paster, W., Weghuber, J., Eckerstorfer, P., Stockinger, H. y Schutz, G.J. (2009). Direct observation and quantitative analysis of Lck exchange between plasma membrane and cytosol in living T cells. *J Biol Chem*. **285**, 6063-6070.

ANEXO

Artículos publicados por la doctoranda durante la realización de la tesis doctoral:

Anton, O., Batista, A., Millan, J., **Andres-Delgado, L.**, Puertollano, R., Correas, I. y Alonso, M.A. (2008). An essential role for the MAL protein in targeting Lck to the plasma membrane of human T lymphocytes. *J Exp Med.* **205**, 3201-3213.

Madrid, R., Aranda, J.F., Rodriguez-Fraticelli, A.E., Ventimiglia, L., **Andres-Delgado, L.**, Shehata, M., Fanayan, S., Shahheydari, H., Gomez, S., Jimenez, A., Martin-Belmonte, F., Byrne, J.A. y Alonso, M.A. (2010). The formin INF2 regulates basolateral-to-apical transcytosis and lumen formation in association with Cdc42 and MAL2. *Dev Cell.* **18**, 814-827.

Andres-Delgado, L., Anton, O.M., Madrid, R., Byrne, J.A. y Alonso, M.A. (2010). Formin INF2 regulates MAL-mediated transport of Lck to the plasma membrane of human T lymphocytes. *Blood.* **116**, 5919-5929.

Portada de la revista.